



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

***Diagnóstico e Controlo Biológico de Nematodes Gastrointestinais nos Mamíferos  
Selvagens Mantidos em Cativo no “Monte Selvagem – Reserva Animal”***

RITA FREITAS DOS REIS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro  
Oliveira

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

COORDINADOR

Dr. Nuno Vicente Prates

2019

LISBOA





UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

***Diagnóstico e Controlo Biológico de Nematodes Gastrointestinais nos Mamíferos  
Selvagens Mantidos em Cativo no “Monte Selvagem – Reserva Animal”***

RITA FREITAS DOS REIS

Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Augusto Farraia e Silva  
Meireles

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

Doutora Maria Manuela Castilho Monteiro  
Oliveira

ORIENTADOR

Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho

COORIENTADOR

Dr. Nuno Vicente Prates

2019

LISBOA

## AGRADECIMENTOS

Não podia deixar passar este momento sem agradecer a todos aqueles que contribuíram para a realização deste documento e para o culminar desta etapa tão importante da minha vida.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, porque sem eles este trabalho não seria possível. Ao Professor Doutor Luís Madeira de Carvalho, obrigada por toda a orientação e conselhos, por me acalmar quando os níveis de *stress* eram demasiado altos e pelas gargalhadas partilhadas. Ao Dr. Nuno Prates, do Hospital Veterinário Muralha de Évora, obrigada pela ajuda e orientação.

À Dra. Ana Gião Gomes, do Hospital Veterinário Muralha de Évora, pela sua disponibilidade e pela simpatia com que me recebeu.

A toda a equipa do Monte Selvagem, pelo carinho com que me receberam. À Joana Pinto Gouveia, Diogo Pinto Gouveia e Ana Paula Gouveia, obrigada por me permitirem aprender na vossa “casa” e realizar todo o estudo. Um obrigado especial aos tratadores, Nuno, Daniela, João, Pedro e todos os outros, pela vossa paciência comigo e por todos os “cocós” recolhidos.

Ao Grupo de Investigação COPAR (GI-2120; UCS, Espanha), por cederem as culturas de fungos nematófagos que permitiram a realização deste estudo. Ao Antonio Palomero e à Maria Isabel Silva, estudantes de doutoramento na Faculdade de Veterinária de Lugo (USC, Espanha), pelos conhecimentos transmitidos na área do controlo biológico com fungos nematófagos. Ao Professor Doutor Adolfo Paz Silva, por toda a ajuda e pela revisão deste trabalho.

À Dra. Lídia Gomes e ao Dr. David Ramilo, por tornarem o laboratório de parasitologia mais animado. Obrigada por toda a ajuda e todas as conversas. Ao Nunzio Sarnino, aluno da Universidade de Napoles “Frederico I”, pelos ensinamentos sobre as técnicas do FLOTAC e Mini-FLOTAC e por todos os momentos divertidos passados no laboratório.

Ao Professor Telmo Nunes, pela ajuda com alguma da parte estatística.

Aos meus amigos de faculdade que sei que levarei para a vida. Obrigada Diana, Fábio, Saramago, Joaninha, Vinagre e André por todas as aventuras, por me permitirem manter a sanidade mental em todas as épocas de exames e por estarem sempre lá quando precisei. Vocês são os melhores! Obrigada ainda a toda a turma D por todos os momentos divertidos passados nas aulas que eu já tenho saudades de ter.

Aos meus amigos de sempre, por me acompanharem já há tantos anos de forma incondicional apesar dos caminhos separados que seguimos depois do secundário. Obrigada Martinha, Sara, Alex e Bruno por todas as férias no Algarve, todos os cafés para descomprimir e todo o apoio. Obrigada Margarida por todas as aventuras juntas desde pequeninas, por me emprestares o Kiko para treinar exames físicos, por essa tua generosidade e por me ajudares sempre que precisei.

Ao Francisco, por ter sido a melhor e mais inesperada surpresa do último ano de faculdade. Obrigada por toda a paciência para me aturares e por toda a ajuda com este trabalho, o teu apoio e incentivo foram fundamentais!

Por último, e porque os últimos são os primeiros, agradeço à minha família por serem a minha base e o meu refúgio até hoje. Aos meus pais, obrigada por nunca me cortarem as asas e me incentivarem sempre a voar mais alto. À minha irmã, obrigada por seres o meu apoio incondicional, contigo sei que posso contar para a vida toda. Aos meus avós, os de perto e os de longe, obrigada pela constante preocupação e por fazerem sempre tudo ao vosso alcance para que eu estivesse bem.

## RESUMO

### ***Diagnóstico e Controlo Biológico de Nematodes Gastrointestinais nos Mamíferos Selvagens Mantidos em Cativeiro no “Monte Selvagem – Reserva Animal”***

Os nematodes gastrointestinais (NGI) são um grande problema nos mamíferos selvagens em cativeiro, pelo que é importante que os Parques Zoológicos disponham de técnicas de diagnóstico eficientes e medidas de controlo alternativas. O Mini-FLOTAC é a mais recente técnica de contagem de ovos por grama de fezes (OPG), que devido à sua maior sensibilidade, exatidão e precisão pode vir a substituir o McMaster no diagnóstico de parasitoses. Os fungos nematófagos constituem um grupo com grandes perspectivas de ser utilizado como método complementar de controlo biológico das helmintoses, já que permitem a redução da utilização de anti-helmínticos, o que por sua vez diminui a probabilidade do aparecimento de resistências. Deste modo, o presente estudo teve como objetivos, caracterizar os parasitas presentes nos mamíferos selvagens de um Parque Zoológico e verificar a eficácia dos fungos *Mucor circinelloides* e *Duddingtonia flagrans* na diminuição de ovos e larvas de NGI destes mesmos animais, comparando as técnicas coprológicas quantitativas de McMaster e do Mini-FLOTAC.

Nos meses de dezembro 2017 e abril 2018 foram colhidas amostras fecais de 30 espécies de mamíferos selvagens e analisadas através das técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC. No total, 47% das espécies encontravam-se parasitadas com NGI, sendo estes estrongilídeos gastrointestinais (EGI) (26,7%), encontrados nos ungulados, *Trichuris* sp. (13,3%), encontrado nos primatas e *Parascaris* sp. (3,3%), encontrado nas zebras. As colheitas de fezes realizadas no mês de abril apresentaram contagens de OPG mais elevadas.

Em maio 2018 foi realizado um ensaio com as fezes de macacos-de-tarrafe, zebras e lamas durante 4 semanas, com dois grupos: caixas de plástico contendo fezes de mamíferos selvagens e esporos de *Mucor circinelloides* (grupo Fungos) e caixas contendo apenas fezes (grupo Controlo), colocadas numa zona exterior com vegetação. Ao fim de cada semana foram retiradas e analisadas duas caixas Fungos e duas Controlo. Nas fezes de macacos-de-tarrafe, verificou-se a existência de uma diferença significativa entre o grupo Controlo e o grupo Fungos ao longo das quatro semanas, para os resultados obtidos através da técnica de McMaster ( $p = 0.04586$ ) e Mini-FLOTAC ( $p = 0.03689$ ). No ensaio utilizando fezes de zebra, apenas se obteve uma diferença biologicamente significativa entre o grupo Controlo e o grupo Fungos ( $p = 0.07814$ ). Os resultados obtidos no ensaio com fezes de lama foram considerados inconclusivos. Não obstante, nas três espécies de mamíferos em estudo foi possível observar microscopicamente a ação nematófaga do fungo sobre os ovos de *Trichuris* sp, *Parascaris* sp. e EGI. Às caixas do grupo Fungos utilizadas para análise na quarta semana (zebras e lamas) foram também adicionados esporos de *D. flagrans*. Através da utilização da técnica de Baermann foi possível identificar larvas de *Cyathostomum* spp. nas fezes de zebra e de *Trichostrongylus axei* nas fezes de lama e verificar uma taxa de redução de 100% nestas últimas.

Para todas as amostras recolhidas ao longo deste trabalho foram sempre realizadas em paralelo as técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC. Quando comparadas todas as contagens obtidas através do teste de Bland Altman verificou-se que não existe uma forte concordância entre as duas técnicas, principalmente quando as contagens de OPG são baixas.

Os resultados deste trabalho demonstram o grande potencial dos fungos nematófagos no controlo de diferentes nematodes gastrointestinais e da técnica do Mini-FLOTAC na deteção de ovos, principalmente quando existem cargas parasitárias baixas.

**Palavras-chave:** nematodes gastrointestinais, McMaster, Mini-FLOTAC, controlo biológico, *Mucor circinelloides*, *Duddingtonia flagrans*

## ABSTRACT

### ***Diagnose and Biological Control of Gastrointestinal Nematodes in Wild Mammals Kept in Captivity at “Monte Selvagem – Reserva Animal”***

Gastrointestinal nematodes (GIN) are a major problem in wild mammals kept in captivity, so it is important that Zoos resort to efficient diagnostic techniques and alternative control measures. The Mini-FLOTAC is the latest egg counting technique, which may replace the McMaster in the diagnosis of parasitosis, due to its greater sensitivity, accuracy and precision. Nematophagous fungi are a group with great prospects of being used as a complementary method of biological control of helminths, thus reducing the use of anthelmintics and, consequently, decreasing the probability of resistance. In this way, the objective of this study was to characterize the parasites present in the wild mammals of a Zoological Park and to verify the efficacy of the fungi *Mucor circinelloides* and *Duddingtonia flagrans* in the reduction of eggs and larvae of GIN from these same animals, while comparing the coprological quantitative techniques of McMaster and Mini-FLOTAC.

In the months of December 2017 and April 2018, fecal samples were collected from 30 wild mammal species and analyzed using McMaster and Mini-FLOTAC. In total, 47% of species were infected with NGI, being these gastrointestinal strongyles (26.7%), found in ungulates, *Trichuris* sp. (13.3%), found in primates, and *Parascaris* sp. (3.3%) found in zebras. Fecal samples collected in April showed higher egg counts.

In May 2018, a study with the faeces of grivet monkeys, zebras and llamas was carried out for 4 weeks, with two groups: plastic boxes containing feces of wild mammals with spores of *Mucor circinelloides* (Fungi group) and boxes containing only feces (Control group), placed outside in an area with a lot of vegetation. At the end of each week, two Fungi and two Control boxes were collected and analyzed. In the faeces of the monkeys, there was a significant difference between the Control group and the Fungi group over the four weeks, for the results obtained by the McMaster technique ( $p = 0.04586$ ) and Mini-FLOTAC ( $p = 0.03689$ ). In the test using zebra faeces, only a biologically significant difference was obtained between the Control group and the Fungi group ( $p = 0.07814$ ). The results obtained in the llama faeces test were considered inconclusive. Nevertheless, it was possible to microscopically observe the action of *M. circinelloides* on the eggs of *Trichuris* sp, *Parascaris* sp. and EGI, in the three species of mammals under study. To the Fungi group boxes used for analysis in the fourth week (zebras and llamas) it was also added spores of *D. flagrans*. Using Baermann technique it was possible to identify *Cyathostomum* spp. larvae in the zebra faeces and *Trichostrongylus axei* larvae in the llama faeces and to verify a 100% reduction rate in the latter.

For all samples collected, McMaster and Mini-FLOTAC techniques were always performed in parallel. When all egg counts obtained were compared using the Bland Altman test, there was no strong agreement between the two techniques, especially when EPG counts were low.

The results of this research demonstrate the great potential of nematophagous fungi in the control of different gastrointestinal nematodes and of the Mini-FLOTAC technique in the detection of eggs, especially when there are low parasite loads.

**Key words:** gastrointestinal nematodes, McMaster, Mini-FLOTAC, biological control, *Mucor circinelloides*, *Duddingtonia flagrans*.

## ÍNDICE

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÍNDICE .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	v
LISTA DE TABELAS.....	vi
LISTA DE GRÁFICOS .....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	vii
I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO .....	1
1. Monte Selvagem – Reserva Animal .....	1
2. Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV- ULisboa.....	2
II INTRODUÇÃO.....	3
III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
1. Parasitas e Zoos .....	5
1.1. Nematodes Gastrointestinais mais Frequentes em Primatas.....	6
1.1.1. <i>Trichuris trichiura</i> .....	8
1.2. Nematodes Gastrointestinais Mais Frequentes em Ungulados Selvagens .....	12
1.2.1. <i>Trichostrongylus axei</i> .....	14
1.2.2. <i>Cyathostomum</i> spp.....	16
1.2.3. <i>Parascaris</i> spp.....	18
2. Técnicas Coprológicas Quantitativas para o Diagnóstico de Nematodes Gastrointestinais em Zoos: McMaster e Mini-FLOTAC.....	20
3. Controlo Integrado de Nematodes Gastrointestinais em Zoos.....	21
3.1. Controlo Biológico .....	23
3.1.1. Fungos Nematófagos .....	23
3.1.1.1. Fungos Nematófagos Predadores .....	25
3.1.1.1.1. <i>Duddingtonia flagrans</i> .....	26
3.1.1.2. Fungos Nematófagos Ovicidas .....	29
3.1.1.2.1. <i>Mucor circinelloides</i> .....	30
IV. OBJETIVOS .....	32
V. MATERIAL E MÉTODOS .....	33
1. Introdução ao Local e Espécies em Estudo.....	33
2. Colheita das Amostras .....	33
3. Técnicas Laboratoriais Coprológicas.....	34
3.1. McMaster.....	34
3.2. Mini-FLOTAC.....	34
3.3. Baermann.....	35
4. Suspensões Fúngicas .....	37



4.1. Contagem da Concentração de Esporos .....	37
5. Ensaio em Caixas .....	38
5.1. Ensaio em Caixas com Fezes de Primatas Infetados com <i>Trichuris trichiura</i> ..	39
5.2. Ensaio em Caixas com Fezes de Ungulados Selvagens Infetados com <i>Parascaris equorum</i> e Estrongilídeos Gastrointestinais .....	40
6. Análise Estatística .....	42
VI. RESULTADOS .....	43
1. Nematodes Presentes nas Espécies de Mamíferos do “Monte Selvagem – Reserva Animal” .....	43
2. Ensaio em Caixas com Fungos Nematófagos .....	46
2.1. Ensaio em Caixas com Fungos Nematófagos e Fezes de Mamíferos Selvagens Infetados com Nematodes Gastrointestinais .....	46
2.1.1. Ação do Fungo <i>Mucor circinelloides</i> sobre Ovos de Nematodes Gastrointestinais .....	46
2.1.2. Ação do Fungo <i>Duddingtonia flagrans</i> sobre Larvas de Nematodes Gastrointestinais .....	51
3. Comparação e Avaliação da Concordância entre Duas Técnicas Coprológicas Quantitativas: McMaster e Mini-FLOTAC .....	53
VII. DISCUSSÃO .....	55
1. Nematodes Presentes nas Espécies de Mamíferos do “Monte Selvagem – Reserva Animal” .....	55
2. Ensaio em Caixas com Fungos Nematófagos e Fezes de Mamíferos Selvagens Infetados com Nematodes Gastrointestinais .....	57
3. Comparação e Avaliação da Concordância entre Duas Técnicas Coprológicas Quantitativas: McMaster e Mini-FLOTAC .....	60
VIII. CONCLUSÃO .....	62
IX. PERSPETIVAS FUTURAS .....	63
X. BIBLIOGRAFIA.....	64
XI. ANEXOS .....	83
Anexo 1 – Taxonomia dos Principais Géneros de Fungos Nematófagos Utilizados Como Controlo Biológico .....	83
Anexo 2 – Espécies de Mamíferos Presentes no Parque Zoológico “Monte Selvagem – Reserva Animal” .....	84
Anexo 3 – Valores de OPG obtidos através das técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC para cada amostra positiva do presente estudo .....	87
Anexo 4 – Poster intitulado “Eficácia do fungo nematófago <i>Mucor circinelloides</i> no controlo de nematodes gastrointestinais presentes em fezes de macacos-de-tarrafe ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )” apresentado nas XI Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora.....	90

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Alguns dos mamíferos presentes no "Monte Selvagem - Reserva Animal" (original).....	4
<b>Figura 2</b> - Ungulados selvagens mantidos em instalação mista no Parque Zoológico "Monte Selvagem - Reserva Animal" (original).....	5
<b>Figura 3</b> - Ciclo de vida de <i>Trichuris trichiura</i> (original).....	10
<b>Figura 4</b> - Ciclo de vida de <i>Trichostrongylus axei</i> (original) .....	15
<b>Figura 5</b> - Ciclo de vida de <i>Cyathostomum</i> spp. (original) .....	17
<b>Figura 6</b> - Ciclo de vida de <i>Parascaris</i> spp. (original) .....	19
<b>Figura 7</b> - Imagem microscópica de esporos provenientes de uma suspensão fúngica. À esquerda, clamidosporo de <i>D. flagrans</i> com uma hifa a desenvolver-se; Ao centro, conídios de <i>D. flagrans</i> incorporados no micélio; À direita, esporos de <i>M. circinelloides</i> . Ampliação: 122x (Cruz, 2015) .....	24
<b>Figura 8</b> - Clamidosporos de <i>Duddingtonia flagrans</i> (original) .....	28
<b>Figura 9</b> - Hifas (1), esporângios (2) e esporos (3) de <i>Mucor circinelloides</i> (original) .....	30
<b>Figura 10</b> - Câmara de McMaster (original) .....	34
<b>Figura 11</b> - Mini-FLOTAC (1) e Fill-FLOTAC (2) (original) .....	34
<b>Figura 12</b> - Método de Baermann modificado (original) .....	36
<b>Figura 13</b> - Colocação de uma alíquota de suspensão fúngica com <i>M. circinelloides</i> numa câmara de Neubauer (original) .....	37
<b>Figura 14</b> - Zona com vegetação onde foram colocadas as caixas para realização dos ensaios (original) .....	38
<b>Figura 15</b> - Conjunto das 16 caixas contendo fezes de macaco-de-tarrafe (original).....	39
<b>Figura 16</b> - Pormenor da etiqueta de uma das caixas (original) .....	39
<b>Figura 17</b> - Ovos de nematodes gastrointestinais presentes nas fezes de alguns dos mamíferos do "Monte Selvagem - Reserva Animal" .....	44
<b>Figura 18</b> - Ação do fungo <i>Mucor circinelloides</i> sobre as diferentes espécies de nematodes do presente estudo .....	51
<b>Figura 19</b> - Larvas de <i>Cyathostomum</i> spp. presente em fezes de zebra (1) e de <i>Trichostrongylus axei</i> presentes em fezes de lama (2) .....	52
<b>Figura 20</b> - Organização taxonómica dos principais géneros de fungos nematófagos implicados no controlo biológico (Raghukumar, 2017; Spatafora et al., 2016) .....	83
<b>Figura 21</b> - Poster intitulado "Eficácia do fungo nematófago <i>Mucor circinelloides</i> no controlo de nematodes gastrointestinais presentes em fezes de macacos-de-tarrafe ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )" apresentado nas XI Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora .....	90

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Anti-helmínticos recomendados no tratamento de <i>T. trichiura</i> em primatas e respectivas doses, vias e frequências de administração (adaptado de Calle & Joslin, 2015).	11
<b>Tabela 2</b> - Características das técnicas McMaster, Mini-FLOTAC e FLOTAC para o diagnóstico de nematodes gastrointestinais (adaptado de Cringoli et al., 2017)	21
<b>Tabela 3</b> - Estudos que demonstram a eficácia de <i>Duddingtonia flagrans</i> em diferentes espécies de animais e respetivos nematodes	27
<b>Tabela 4</b> - Estudos que demonstram a eficácia de <i>Mucor circinelloides</i> em diferentes espécies de animais e respetivos nematodes	31
<b>Tabela 5</b> - Parasitas identificados nas espécies de mamíferos do "Monte Selvagem - Reserva Animal" durante o mês de Dezembro	43
<b>Tabela 6</b> - Valores de OPG das amostras iniciais utilizadas no ensaio em caixas com <i>Mucor circinelloides</i>	46
<b>Tabela 7</b> - Resultados do ensaio em caixas com o fungo <i>Mucor circinelloides</i> e fezes de macaco-de-tarrafe infetados com <i>Trichuris</i> spp.	47
<b>Tabela 8</b> - Taxas de Viabilidade e Inviabilidade dos grupos Controlo e Fungos no ensaio em caixas com o fungo <i>Mucor circinelloides</i> e fezes de macaco-de-tarrafe infetados com <i>Trichuris</i> spp.	48
<b>Tabela 9</b> - Resultados do ensaio em caixas com o fungo <i>Mucor circinelloides</i> e fezes de zebra infetadas com <i>Parascaris</i> spp.	49
<b>Tabela 10</b> - Taxas de Viabilidade e Inviabilidade dos grupos Controlo e Fungos no ensaio em caixas com o fungo <i>Mucor circinelloides</i> e fezes de zebra infetadas com <i>Parascaris</i> spp.	50
<b>Tabela 11</b> - Resultados do ensaio em caixas com o fungo <i>Mucor circinelloides</i> e fezes de lama infetadas com EGI	50
<b>Tabela 12</b> - Resultados das contagens de larvas em fezes de zebra	51
<b>Tabela 13</b> - Resultados das contagens de larvas em fezes de lama	52
<b>Tabela 14</b> - Espécies de mamíferos presentes no Parque Zoológico "Monte Selvagem - Reserva Animal" e respetivos tipos de instalação e alimentação (sombreado a verde encontram-se as espécies que participaram no estudo com fungos nematófagos)	84
<b>Tabela 15</b> - Valores de OPG obtidos através das técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC para cada amostra positiva do presente estudo	87

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 1</b> - Comparação entre os OPG obtidos no mês de dezembro e no mês de abril através da técnica de McMaster	45
<b>Gráfico 2</b> - Comparação entre os OPG obtidos no mês de dezembro e no mês de abril através da técnica do Mini-FLOTAC	45
<b>Gráfico 3</b> - Comparação entre os resultados obtidos entre o grupo Controlo e o grupo Fungos para cada uma das quatro semanas do ensaio em caixas com fezes de macaco-de-tarrafe (técnica de McMaster)	47
<b>Gráfico 4</b> - Comparação entre os resultados obtidos entre o grupo Controlo e o grupo Fungos para cada uma das quatro semanas do ensaio em caixas com fezes de macaco-de-tarrafe (técnica do Mini-FLOTAC)	48
<b>Gráfico 5</b> - Gráfico de dispersão dos valores de OPG (transformados em logaritmo de base 10) obtidos através das técnicas de McMaster e do Mini-FLOTAC	53
<b>Gráfico 6</b> - Gráfico de Bland Altman para avaliar a concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC (transformados em valores de logaritmo de base 10)	54

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ADN – Ácido desoxirribonucleico

APVMA – *Australian Pesticides and Veterinay Medicines Authority*

COPAR – Grupo de investigação para o controlo de parasitas em animais e pessoas: diagnóstico, prevenção e tratamento

EGI – Estrongilídeos gastrointestinais

L1 – Larva de 1º estágio

L2 – Larva de 2º estágio

L3 – Larva de 3º estágio

L4 – Larva de 4º estágio

L5 – Larva de 5º estágio

LPG – Larvas por grama de fezes

NaCl – Cloreto de sódio

NGI – Nematodes gastrointestinais

OPG – Ovos por grama de fezes

ZnSO<sub>4</sub> – Sulfato de zinco



## **I. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS DURANTE O ESTÁGIO**

No âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, foi realizado um estágio curricular com a duração de 6 meses. Este dividiu-se maioritariamente em duas vertentes: clínica e manejo de animais selvagens em contexto zoológico e investigação sobre os nematodes gastrointestinais presentes em mamíferos selvagens mantidos em cativeiro e o seu possível diagnóstico e controlo biológico.

### **1. Monte Selvagem – Reserva Animal**

Durantes os meses de dezembro 2017 e janeiro 2018 foi realizado um estágio em clínica e manejo de animais selvagens no Parque “Monte Selvagem – Reserva Animal”, correspondendo a um total de cerca de 300 horas.

O “Monte Selvagem – Reserva Animal” é um espaço com 20 ha situado em Lavre, concelho de Montemor-o-Novo, distrito de Évora. O parque privado aloja 60 espécies, num total de cerca de 350 animais, sendo que nenhum é oriundo do seu habitat natural, e está aberto ao público durante 9 meses do ano, de fevereiro a outubro. Tem como missão proporcionar habitats alternativos para animais que necessitem e promover o contacto das populações com a Natureza, protegê-la, conservá-la e educar para a sua sustentabilidade (Monte Selvagem, 2018).

Ao longo do estágio foi possível a participação em diversos casos clínicos, sendo a maioria casos de traumatologia, mas também dermatologia, gastroenterologia ou pediatria. Em todas estas situações foi possível participar de forma ativa no seu tratamento. Houve ainda a oportunidade de realizar necrópsias após a morte de alguns animais e de observar uma colheita de sangue realizada em lémures.

No decurso dos dois meses, procedeu-se à recolha de amostras de fezes de todos os mamíferos habitantes do parque. Recorrendo a um pequeno laboratório de campo improvisado foi possível realizar um rastreio parasitológico e diagnosticar algumas parasitoses gastrointestinais, usando as técnicas coprológicas quantitativas do McMaster e do Mini-FLOTAC.

No âmbito do enriquecimento ambiental, foram realizadas algumas atividades em primatas, com o objetivo de lhes dificultar o acesso à comida, estimulando os seus instintos naturais. Para além disto, foram efetuadas outras atividades relacionadas com a manutenção do parque: limpeza e desinfeção de todas as instalações interiores e exteriores, preparação e distribuição da alimentação, contagem diária dos animais e informatização de dados necessários à gestão do parque e dos animais.

## 2. Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da FMV- ULisboa

O estágio realizado no Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias dividiu-se em dois momentos distintos no tempo.

O primeiro, nos meses de outubro e novembro de 2017, permitiu a consolidação dos conhecimentos relativos à identificação de diferentes parasitas e à realização das técnicas coprológicas mais frequentemente utilizadas, tanto qualitativas, como o esfregaço fecal, a flutuação e a sedimentação, como quantitativas, como os métodos de McMaster (para a contagem de ovos e oocistos) e o de Baermann (para a contagem de larvas). Relativamente às técnicas quantitativas, foi ainda possível aprender com um estudante de Mestrado italiano dois novos métodos de flutuação para contagem de ovos, não lecionados durante o curso: FLOTAC e Mini-FLOTAC.

Aproveitando a presença, nessa altura, de um estudante de Doutoramento espanhol, cujo trabalho se centrava no controlo biológico com fungos nematófagos, foi possível a aprendizagem dos principais conceitos relativos ao tema e o desenvolvimento do desenho experimental do presente estudo. Assim, durante o estágio, foi possível aprender a distinguir e quantificar duas espécies de fungos distintas (*Duddingtonia flagrans* e *Mucor circinelloides*), bem como qual o seu modo de ação sobre os ovos e a identificar os tipos de alterações provocadas nos mesmos.

Durante estes dois meses, foram possíveis a participação e a realização de técnicas laboratoriais em alguns dos trabalhos que se desenvolviam no laboratório, como o rastreio parasitário de ruminantes utilizando o FLOTAC e o controlo biológico de nematodes de galinhas poedeiras com fungos nematófagos.

A segunda parte do estágio realizou-se durante os meses de maio e junho de 2018 e teve como objetivo verificar a eficácia de fungos nematófagos no controlo biológico de nematodes gastrointestinais de primatas e ungulados selvagens mantidos em cativeiro. Para o estudo foram utilizadas fezes de animais selvagens parasitados nas quais se colocaram inóculos de *D. flagrans* ou *M. circinelloides*. As fezes foram colocadas em caixas no exterior de modo a simular o ambiente natural das mesmas. Para a contagem dos ovos (realizada todas as semanas) foram sempre usadas paralelamente as técnicas de McMaster e do Mini-FLOTAC. Para a contagem de larvas (realizada na última semana do estudo) foi utilizada a técnica de Baermann.

Para além do desenvolvimento do presente estudo, houve ainda a oportunidade de transmitir os conhecimentos relativos à técnica do Mini-FLOTAC a futuros estagiários do laboratório e a profissionais médico-veterinários e de apresentar um *poster* nas XI Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora (Anexo 4).

## II INTRODUÇÃO

Os nematodes gastrointestinais continuam a ser um grande problema presente nos mamíferos selvagens mantidos em cativeiro (Panayotova-Pencheva, 2013). Com o aumento das resistências aos anti-helmínticos (Goossens, Dorny, Vercammen, & Vercruysse, 2005; Young, Jensen, & Craig, 2000), torna-se cada vez mais importante que os Parques Zoológicos disponham de técnicas coprológicas mais sensíveis e exatas, bem como medidas de controlo parasitário alternativas aos fármacos frequentemente utilizados.

O método de McMaster é a técnica de flutuação para a contagem de ovos fecais mais utilizada em todo o mundo (Modrý et al., 2017). No entanto, as suas baixas sensibilidade e exatidão (Cringoli et al., 2017) dão muitas vezes resultados falso negativos ou contagens muito superiores às reais, levando por vezes à aplicação de terapêutica química, sem que esta seja realmente necessária. Em Itália, foi desenvolvida uma nova técnica, o FLOTAC e mais recentemente, o Mini-FLOTAC, com sensibilidade, exatidão e precisão bastante superiores à do método de McMaster (Cringoli et al., 2017; Cringoli, Rinaldi, Maurelli, & Utzinger, 2010), podendo vir a substituir este último no diagnóstico de parasitoses de animais selvagens em cativeiro (Alvarado-Villalobos et al., 2017; Maesano, Capasso, Ianniello, Cringoli, & Rinaldi, 2014).

O Controlo Biológico consiste no controlo de pestes utilizando antagonistas naturais (Larsen, 2000). Os fungos nematófagos, nomeadamente *Duddingtonia flagrans* e *Mucor circinelloides*, constituem um grupo que tem vindo a ser bastante estudado e com grandes perspetivas de ser usado como método de controlo biológico das helmintoses em Parques Zoológicos (Arias, Cazapal-Monteiro, Valderrábano, et al., 2013; Cazapal-Monteiro et al., 2014; Miguélez Riádigos et al., 2014; Palomero et al., 2018).

Posto isto, o presente trabalho focou-se no grupo dos mamíferos mantidos em cativeiro no Parque Zoológico “Monte Selvagem – Reserva Animal” (Figura 1), no diagnóstico das suas parasitoses gastrointestinais e nas alternativas ao seu controlo.



**Figura 1** - Alguns dos mamíferos presentes no "Monte Selvagem - Reserva Animal" (original)



**Legenda:** 1 - Pecari de colar (*Pecari tajacu*); 2 – Rena (*Rangifer tarandus*); 3 – Cervicapra (*Antilope cervicapra*); 4 – laque (*Bos grunniens*); 5 – Watussi (*Bos taurus*); 6 – Gamo (*Dama dama*); 7 – Elande (*Taurotragus oryx*); 8 – Cobus (*Kobus leche*) (originais).



### III REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 1. Parasitas e Zoos

Segundo Goodwin (1991), "Zoos and the science of Parasitology have developed and flourished together in a fruitful symbiosis". Esta simbiose é ainda hoje importante na medida em que nos deparamos atualmente com novos desafios no controlo de parasitas em animais mantidos em cativeiro. O aparecimento de novos agentes, bem como a reemergência de outros previamente controlados, o potencial zoonótico que alguns destes podem apresentar, o surgimento de resistências aos anti-helmínticos utilizados e ainda a chegada de novas medidas de controlo alternativas são alguns dos pontos para os quais os veterinários de zoo têm de estar sensibilizados de maneira a garantir riscos mínimos para os animais e para a Saúde Pública (Madeira de Carvalho et al., 2016).

No seu habitat natural, os animais apresentam normalmente uma resistência contra os parasitas ou vivem em equilíbrio com estes. Mas a mudança da vida em liberdade para cativeiro, bem como o *stress* que lhe está associado, aumenta a probabilidade de se tornarem mais vulneráveis às infeções parasitárias (Atanaskova, Kochevski, & Nikolovski, 2011; Goossens, Dorny, Boomker, Vercammen, & Vercruysse, 2005).

A atual tendência dos Jardins Zoológicos para manter os animais em instalações mistas de grandes dimensões (Figura 2), aliada ao facto de que em animais selvagens os sinais clínicos só se manifestam na presença de elevadas cargas parasitárias, dificulta a perceção da existência de possíveis infeções (Goossens, Dorny, Boomker, et al., 2005).

**Figura 2** - Ungulados selvagens mantidos em instalação mista no Parque Zoológico "Monte Selvagem - Reserva Animal" (original)



Vários estudos realizados em Parques Zoológicos da Europa apontam os helmintes como o grupo de parasitas mais diagnosticado, sendo o Filo Nematoda o mais comum (Atanaskova et al., 2011; Bartosik & Górski, 2010; Fagiolini et al., 2010; Gurler, Beyhan, Acici, Bolukbas, & Umur, 2010; Kvapil et al., 2017; Nosal et al., 2016; Panayotova-Pencheva, 2013). Os nematodes mais frequentemente representados pertencem à Ordem Ascaridida, seguidos pelas ordens Strongylida, Enoplida (famílias Trichuridae e Capillariidae), Oxyurida e Rhabditida (Panayotova-Pencheva, 2013).

Em Portugal, Cruz e Silva et al. (1973 citado por Panayotova-Pencheva, 2013) realizaram necrópsias e exames coprológicos aos animais do Jardim Zoológico de Lisboa e verificaram que na maioria dos animais parasitados o grupo mais frequentemente encontrado era o dos nematodes: Strongyloidea, Trichuroidea, Ascaridoidea, Rhabdiasioidea e Oxyuriodea.

### **1.1. Nematodes Gastrointestinais mais Frequentes em Primatas**

Tanto os helmintes como os protozoários são causas comuns de doença gastrointestinal em primatas (Calle & Joslin, 2015). Dentro dos helmintes, os nematodes são os parasitas mais frequentemente presentes, sendo o grupo dominante no que toca à quantidade de espécies encontradas (Graham, 1960). Os primatas podem infetar-se através da ingestão de ovos ou de L3 presentes nas fezes e no ambiente, ou através da penetração de larvas na pele (Healy & Myers, 1973 citado por Cameira, 2018).

De seguida será feita referência aos nematodes gastrointestinais mais frequentes em primatas do Velho e Novo Mundos.

Dentro da ordem Strongylida os géneros mais comuns em primatas são *Oesophagostomum*, *Ternidens*, *Ancylostoma*, *Necator* e *Molineus*.

Os nematodes *Oesophagostomum* spp. são os que mais se destacam em primatas pela frequência de infeção e pela sua importância parasitária, sendo pelo menos oito as espécies deste género que parasitam estes animais (Graham, 1960). Esta parasitose é mais frequente em macacos do Velho Mundo e rara nos do Novo Mundo, sendo *O. apiostomum* a espécie que mais frequentemente ocorre no cólon dos primeiros (Calle & Joslin, 2015; Whitney, 1974). Vários estudos demonstraram a presença deste parasita, tanto em animais de vida livre, como de cativeiro (Atanaskova et al., 2011; Kooriyama et al., 2012; Kouassi et al., 2015; Legesse & Erko, 2004; Munene et al., 1998; Mutani, Rhynd, & Brown, 2003; Terio et al., 2018; Wren, Gillespie, Camp, & Remis, 2015).

*Ternidens diminutus* ocorre no ceco e cólon de primatas do Velho Mundo e parasita também o Homem. Apresenta características comuns a *Ancylostoma* sp., uma vez que se alimenta de sangue ao aderir à mucosa do intestino, e a *Oesophagostomum* sp., já que tem a capacidade de formar nódulos na parede do cólon (Whitney, 1974).

A ancilostomose é provocada pelos nematodes dos géneros *Ancylostoma* e *Necator*. *Ancylostoma duodenale* e *Necator americanus* são ambos parasitas que afetam não só o Homem, mas também primatas, sendo o primeiro mais comum em macacos do Velho Mundo e o segundo nos do Novo Mundo (Taylor, Coop, & Wall, 2016).

Os nematodes *Molineus* spp. são frequentes em primatas do Novo Mundo e caracterizam-se pela formação de quistos encapsulando as formas adultas no lúmen do intestino (Durette-Desset, Fribourg-Blanc, & Vuong, 2001; Whitney, 1974).

A identificação destas espécies baseia-se muito na morfologia dos adultos (encontrados em necrópsia, por exemplo), sendo que a identificação através da visualização dos ovos por técnicas coprológicas é bastante difícil, pois estes são muito semelhantes morfológicamente entre todas as espécies deste grupo. O isolamento de L3 apenas permite a identificação até ao género. As técnicas moleculares são as únicas que permitem utilização de ovos e larvas para identificação até à espécie (Ghai, Chapman, Omeja, Davies, & Goldberg, 2014).

Os nematodes *Strongyloides* spp. (ordem Rhabditida) são parasitas não só presentes em primatas no seu habitat natural (Hussain, Ram, Kumar, Shivaji, & Umapathy, 2013; Kooriyama et al., 2012; Kouassi et al., 2015; Mutani et al., 2003; Narat et al., 2015; Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2017; Wren et al., 2015), mas também naqueles que vivem em cativeiro (Adetunji, 2014). *S. fülleborni* foi identificado em macacos do Velho Mundo, como é o caso dos macacos-do-Japão (Arizono, Yamada, Tegoshi, & Onishi, 2012; Horii, Imada, Yanagida, Usui, & Mori, 1982; MacIntosh, Hernandez, & Huffman, 2010), enquanto *S. cebus* se encontra presente em macacos do Novo Mundo (Mati, Ferreira Junior, Pinto, & de Melo, 2013). A principal espécie responsável pela infeção em humanos é *S. stercoralis*. Sendo que é mais frequente em chimpanzés (Hasegawa et al., 2009 citado por Cameira, 2018), foi também já encontrada em macacos do Velho Mundo (Kouassi et al., 2015). Existe portanto um potencial risco zoonótico associado a esta parasitose (Taylor et al., 2016). Devido às migrações larvares, as espécies do género *Strongyloides* apresentam elevada morbilidade, sendo que *S. stercoralis* é especialmente patogénico dado a sua capacidade de autoinfeção que inevitavelmente conduzirá a uma hiperinfeção (Calle & Joslin, 2015).

Os oxiurídeos (ordem Oxyurida) presentes em primatas encontram-se representados pelos géneros *Enterobius*, *Trypanoxyuris* e *Oxyuronema* (Calle & Joslin, 2015). Raramente são detetados em primatas de vida livre, já que os métodos coprológicos de rotina muitas vezes falham na deteção destes parasitas (Bowman, 2014), sendo a necrópsia ou a observação da zona perianal dos animais (local onde as fêmeas depositam os seus ovos) formas mais viáveis de confirmar a infeção (Ashford et al., 2000 citado por Cameira, 2018). O género *Enterobius*, frequentemente representado pela espécie *Enterobius vermicularis*, é descrito principalmente em espécies do Velho Mundo (Kooriyama et al., 2012; Munene et al., 1998). Já os géneros *Trypanoxyuris* e *Oxyuronema* são encontrados em primatas do Novo Mundo (Kreis, 1932; Pinto, Ferreira Junior, Mati, & de Melo, 2013; Solórzano-García & Pérez-Ponce de León, 2017). Os oxiurídeos apresentam potencial zoonótico, principalmente *E. vermicularis* que é a espécie que também parasita o Homem (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016).

A ordem Spirurida constitui um grupo de nematodes que necessitam que um artrópode atue como hospedeiro intermediário para que o seu ciclo de vida se complete (Bowman, 2014). Em primatas, os principais géneros são *Gongylonema* e *Physaloptera*, ambos afetando o trato gastrointestinal superior (Calle & Joslin, 2015). *G. macrogubernaculum* é específico de macacos do Novo e Velho Mundos, enquanto *G. pulchrum* afeta não só primatas, como também outros mamíferos e o homem. Um estudo realizado num parque zoológico no Japão refere a possibilidade de transmissão por escaravelhos e baratas e a variedade de espécies suscetíveis de serem parasitadas por *G. pulchrum* como fatores facilitadores da disseminação da infeção em ambiente zoológico (Sato, Une, & Takada, 2005).

O género *Trichuris* (ordem Enoplida) encontra-se presente em diversas espécies de primatas, tanto em cativeiro (Adetunji, 2014; Dawet, Yakubu, & Butu, 2013; M. Li et al., 2015) como de vida livre (Kouassi et al., 2015; Legesse & Erko, 2004; Wren et al., 2015), a maioria das vezes com prevalências elevadas. Por ter sido o único género de parasita identificado nos primatas do presente estudo merece destaque especial neste capítulo.

#### **1.1.1. *Trichuris trichiura***

Os parasitas do género *Trichuris* encontram-se presentes no ceco e cólon de uma grande variedade de mamíferos (Bowman, 2014; Melfi & Poyser, 2007). A espécie que infeta os primatas é *Trichuris trichiura* (Calle & Joslin, 2015; Strait, Else, & Eberhard, 2012) e pertence ao Filo Nematoda, Classe Adenophorea, Ordem Enoplida, Superfamília Trichuroidea, Família Trichuridae (Bowman, 2014). Apresenta uma distribuição cosmopolita, mas mais prevalente nos trópicos e subtrópicos (Strait et al., 2012).

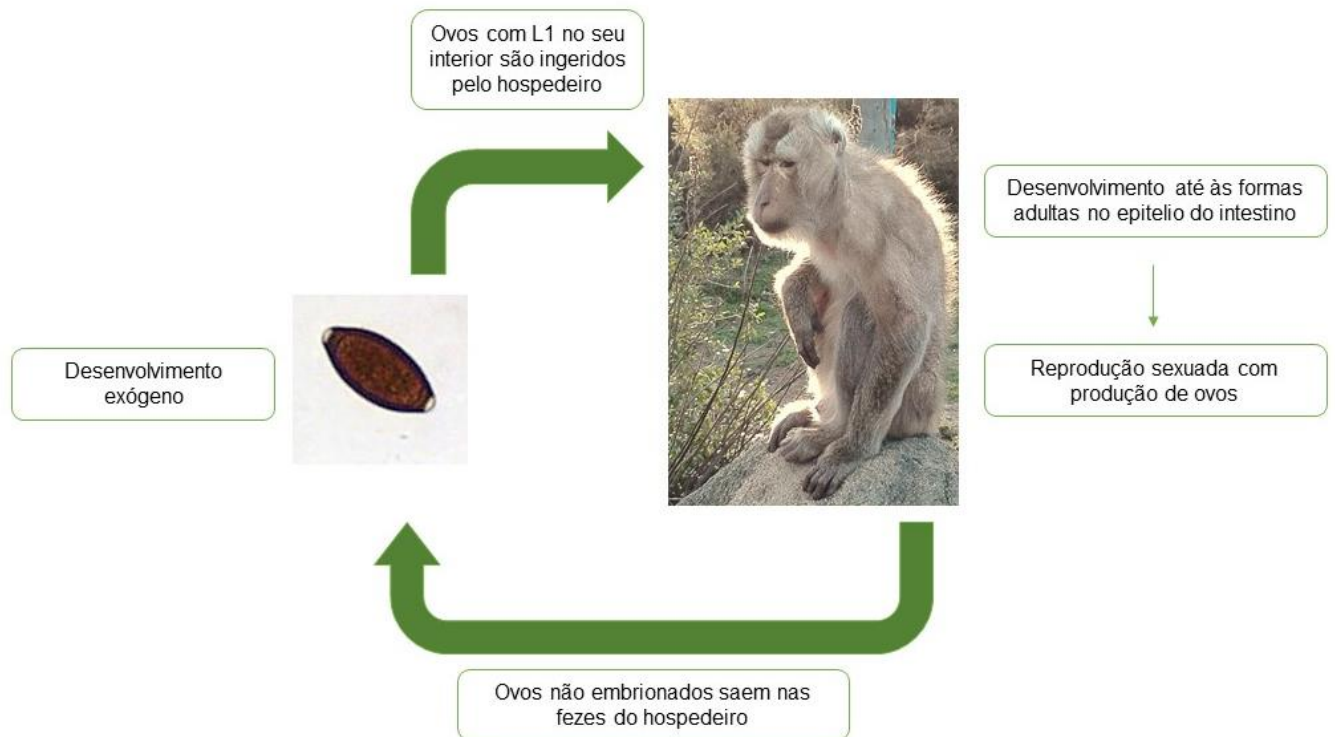
## **Identificação**

Os ovos de *Trichuris* spp. apresentam forma de limão e são bioperculados com dois tampões bem definidos. Os adultos têm corpo “em forma de chicote”, sendo que a extremidade anterior delgada está fixa à parede do intestino grosso (são hematófagos e alimentam-se por capilaridade) e a extremidade posterior dilatada está livre no lúmen (Bowman, 2014). As fêmeas têm aproximadamente 3.5–5.0 cm de comprimento e cauda afilada, enquanto que os machos são ligeiramente mais curtos com 3.0–4.5 cm com cauda em espiral (Taylor et al., 2016).

## **Ciclo de Vida**

O ciclo de vida de *T. trichiura* (Figura 3) é monoxeno (Abee et al., 2012). As formas adultas reproduzem-se sexualmente no intestino grosso e produzem ovos que saem do organismo para o ambiente externo através das fezes do animal (Brooker, Clements, & Bundy, 2006). Estes ovos não são embrionados e vão sofrer desenvolvimento exógeno. Ao fim de 1 mês já possuem uma larva de primeiro estágio (L1) no seu interior, sendo esta a forma infetante. Após a sua ingestão todo o desenvolvimento até à forma adulta irá ocorrer no epitélio do intestino (Bowman, 2014). O período pré-patente deste parasita não é ainda totalmente conhecido, mas é normalmente considerado como sendo cerca de 60 dias (Bundy & Cooper, 1989). Os ovos podem permanecer viáveis no solo durante vários meses, o que predispõe à reinfeção de animais em espaços confinados após o tratamento (Bowman, 2014; Brooker et al., 2006). No entanto, em condições de temperaturas superiores a 37-38°C os ovos não se irão desenvolver até à fase infetante (Bundy & Cooper, 1989).

**Figura 3** - Ciclo de vida de *Trichuris trichiura* (original)



### Sinais Clínicos

Infeções leves não costumam causar problemas clínicos significantes. No entanto, com cargas parasitárias elevadas há descrições de anorexia, diarreia mucosa acinzentada e, em alguns casos, morte (Strait et al., 2012; Taylor et al., 2016).

### Diagnóstico

O diagnóstico desta parasitose é feito pela identificação de ovos nas fezes através das técnicas coprológicas de flutuação (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016). Para estudos mais específicos são utilizadas técnicas moleculares (Doležalová et al., 2015; Ghai et al., 2014; Yao, Walkush, Shim, Cruz, & Ketzis, 2017).

### Terapêutica

Os anti-helmínticos recomendados para o tratamento de *T. trichiura* em macacos do Novo e Velho Mundos são o mebendazol, flubendazol e levamisol (Tabela 1) (Calle & Joslin, 2015; Strait et al., 2012; Taylor et al., 2016).

**Tabela 1** - Anti-helmínticos recomendados no tratamento de *T. trichiura* em primatas e respectivas doses, vias e frequências de administração (adaptado de Calle & Joslin, 2015)

Fármaco	Dose	Via de Administração	Frequência de Administração
<b>Mebendazol</b>	15 mg/kg	PO	SID durante 3 dias
<b>Flubendazol 5%</b>	27-50 mg/kg	PO	BID durante 5 dias
<b>Levamisol</b>	7,5 mg/kg	SC	1 administração,
	10 mg/kg	PO	repetir passados 15 dias

Reichard et al. (2008) avaliaram a eficácia da utilização de febendazol formulado diretamente numa ração específica para primatas em babuínos infetados com *T. trichiura*. A excreção de ovos era interrompida aos 7 dias após o tratamento e estes só reapareciam nas fezes 119 dias depois, provando ser um método eficaz no tratamento da tricurirose em babuínos.

Kagira et al. (2011) demonstraram uma elevada eficácia do uso associado de albendazol e ivermectina no tratamento de *T. trichiura* e *Strongyloides* spp. em macacos do Velho Mundo.

### Potencial Zoonótico

A espécie *Trichuris trichiura* é comumente vista como a única do género *Trichuris* que infecta uma imensa variedade de primatas, tendo também o Homem como hospedeiro definitivo (Calle & Joslin, 2015; Taylor et al., 2016). Isto acarreta um grave problema de saúde pública, já que *T. trichiura* é facilmente transmitido entre humanos e primatas não humanos, sendo por isso considerado uma importante zoonose que afeta cerca de 465 milhões de pessoas em todo o mundo (Pullan, Smith, Jasrasaria, & Brooker, 2014).

No entanto, o amplo espectro de hospedeiros suscetíveis de serem infetados por *T. trichiura* levanta algumas dúvidas se será realmente apenas uma única espécie a responsável por esta parasitose em primatas e humanos. Como tal, foram desenvolvidos alguns estudos com recurso a técnicas moleculares (Doležalová et al., 2015; Ghai et al., 2014) que sugerem que *T. trichiura* possa de facto consistir num conjunto de diferentes subespécies, sendo que algumas parasitam apenas primatas e outras apenas humanos. Não obstante, existem sequências de ADN analisadas que continuam a mostrar altos níveis de similaridade entre *T. trichiura* isolado de primatas e de humanos e, portanto, o potencial zoonótico deste parasita mantém-se uma realidade (Doležalová et al., 2015; Ghai et al., 2014; Yao, Walkush, Shim, Cruz, & Ketzis, 2017).



Em primatas mantidos em cativeiro, os tratadores são quem terá um maior contacto com os animais e com as suas fezes. Um estudo realizado em cinco Zoos na Bélgica (Levecke et al., 2015) propôs-se a verificar se existia transmissão zoonótica de alguns parasitas gastrointestinais entre primatas e os seus tratadores. Foi observada a presença de *T. trichiura* nos tratadores de zoos em que a prevalência deste parasita em primatas era elevada, o que sugeria que poderia haver transmissão. Por este motivo, é recomendado grande cuidado higiénico dos tratadores e das instalações (Taylor et al., 2016).

No entanto, não são apenas os primatas que transmitem esta zoonose aos humanos, mas o contrário também se verifica, podendo até prejudicar espécies em risco de extinção. Um estudo realizado na Índia (Hussain et al., 2013), verificou uma maior prevalência de *T. trichiura* em populações de macaco-cauda-de-leão que vivem em proximidade a zonas fortemente humanizadas.

## **1.2. Nematodes Gastrointestinais Mais Frequentes em Ungulados Selvagens**

Apesar dos extensos períodos de quarentena praticados, exames coprológicos realizados e tratamentos anti-helmínticos efetuados, os nematodes gastrointestinais continuam a ser um importante problema em ungulados silvestres mantidos em cativeiro (Goossens, Dorny, Boomker, et al., 2005).

Nas famílias Suidae e Tayassuidae os nematodes gastrointestinais de maior importância são *Ascaris suum*, *Strongyloides ramsoni*, *Oesophagostomum* spp. e *Hyoststrongylus* spp. (Sutherland-Smith, 2015).

No que diz respeito ao grupo dos ruminantes (Famílias Bovidae, Cervidae e Camelidae), os parasitas mais característicos do trato gastrointestinal são os estrongilídeos gastrointestinais (EGI) (Hoberg, Kocan, & Rickard, 2001). Estes agrupam-se dentro da ordem Strongylida, nomeadamente nas superfamílias Trichostrongyloidea, Strongyloidea e Ancylostomatoidea (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016).

Estas três superfamílias apresentam um ciclo de vida direto, sendo a larva de 3º estágio (L3) a forma infetante. As fêmeas libertam os típicos ovos estrongilídeos, de superfície lisa e forma elipsoidal, contendo no seu interior um embrião ou larva, dependendo do seu estágio de desenvolvimento (Bowman, 2014). Devido a esta similaridade entre ovos de diferentes géneros e espécies (com exceção para *Nematodirus* spp.) a distinção entre estes só poderia ser efetuada através de medições e cálculos que não são práticos numa contagem de ovos realizada no terreno. Uma vez que existem grandes diferenças de patogenicidade entre as

diferentes espécies deste grupo, torna-se imprescindível uma identificação até pelo menos ao género, de maneira a avaliar a importância da infeção e a eficácia do tratamento anti-helmíntico. O método *ante-mortem* disponível para o fazer é através da identificação de larvas presentes nas fezes ou obtidas através de coprocultura (Van Wyk, Cabaret, & Michael, 2004).

Dos estrongilídeos gastrointestinais, os géneros mais comumente presentes em ruminantes em cativeiro são *Trichostrongylus*, *Ostertagia*, *Haemonchus*, *Cooperia*, *Nematodirus* (Trichostrongyloidea), *Chabertia* (Strongyloidea) e *Bunostomum* (Ancylostomatoidea) (Bravo, 2015; Masters & Flach, 2015; Wolfe, 2015). Estudos realizados em Jardins Zoológicos Europeus têm demonstrado a presença destes parasitas no seu efetivo. Para além dos típicos estrongilídeos, também parasitas do género *Trichuris* são frequentemente assinalados, embora de espécies diferentes da encontrada em primatas (Dărăbuș, Afrenie, Hotea, Imre, & Morariu, 2014; Fagiolini et al., 2010; Geraghty, Mooney, & Pike, 1981; Goossens, Dorny, Boomker, Vercammen, & Vercruysse, 2005; Gurler et al., 2010; Kvapil et al., 2017; Maesano, Capasso, Ianniello, Cringoli, & Rinaldi, 2014; Nosal et al., 2016).

Em relação à família Equidae, são extensos os estudos realizados no âmbito da parasitologia dos equinos domésticos, enquanto a literatura sobre equinos selvagens em parques zoológicos é escassa e existe pouca informação sobre os parasitas destes animais no seu habitat natural (Epe, Kings, Stoye, & Böer, 2001). Nos equinos não domésticos, os principais parasitas gastrointestinais pertencem aos géneros *Strongyloides*, *Parascaris*, *Oxyuris* e ainda à família Strongylidae (Janssen & Allen, 2015). Alguns estudos realizados principalmente em zebras, mas também noutros equinos selvagens mantidos em cativeiro, demonstraram a presença destes mesmos parasitas (Bartosik & Górski, 2010; Dărăbuș et al., 2014; Epe et al., 2001; Fagiolini et al., 2010; Geraghty et al., 1981; Kuzmina, Kharchenko, Zvegintsova, Zhang, & Liu, 2013; Kvapil et al., 2017; Maesano et al., 2014; Pérez Córdón et al., 2008).

A família Strongylidae afeta equinos domésticos e selvagens por todo o mundo e pode ser dividida em duas subfamílias: Strongylinae (estrongilíneos ou “grandes estrôngilos”) e Cyatosthominiae (ciatostomíneos ou “pequenos estrôngilos”). Enquanto os nematodes da primeira subfamília são muito mais patogénicos (nomeadamente *Strongylus vulgaris*, *S. edentatus* e *S. equinus*, devido às suas migrações larvares complexas e causadoras de grandes danos ao organismo), os ciatostomíneos são muito mais frequentes, ultrapassando os estrongilíneos tanto em número de espécies como em número de indivíduos, sendo muito abundantes e também patogénicos na sua fase larvar hipobiótica (Bowman, 2014; Lichtenfels, Kharchenko, & Dvojnos, 2008).

No presente trabalho, foram identificadas três espécies de nematodes gastrointestinais no grupo dos ungulados, que serão agora abordadas com maior pormenor.

### **1.2.1. *Trichostrongylus axei***

O nematode *Trichostrongylus axei* é um parasita do abomaso que afeta principalmente ruminantes, sendo também encontrado no estômago de cavalos, lagomorfos, suínos e, ocasionalmente, no Homem. Algumas espécies, como é o caso dos lamas, são hospedeiros alternativos, infetando-se quando partilham a folha de pastagem com outros ruminantes hospedeiros naturais de *T. axei*. Este parasita pertence ao Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida, Superfamília Trichostrongyloidea, Família Trichostrongylidae e apresenta distribuição cosmopolita (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016).

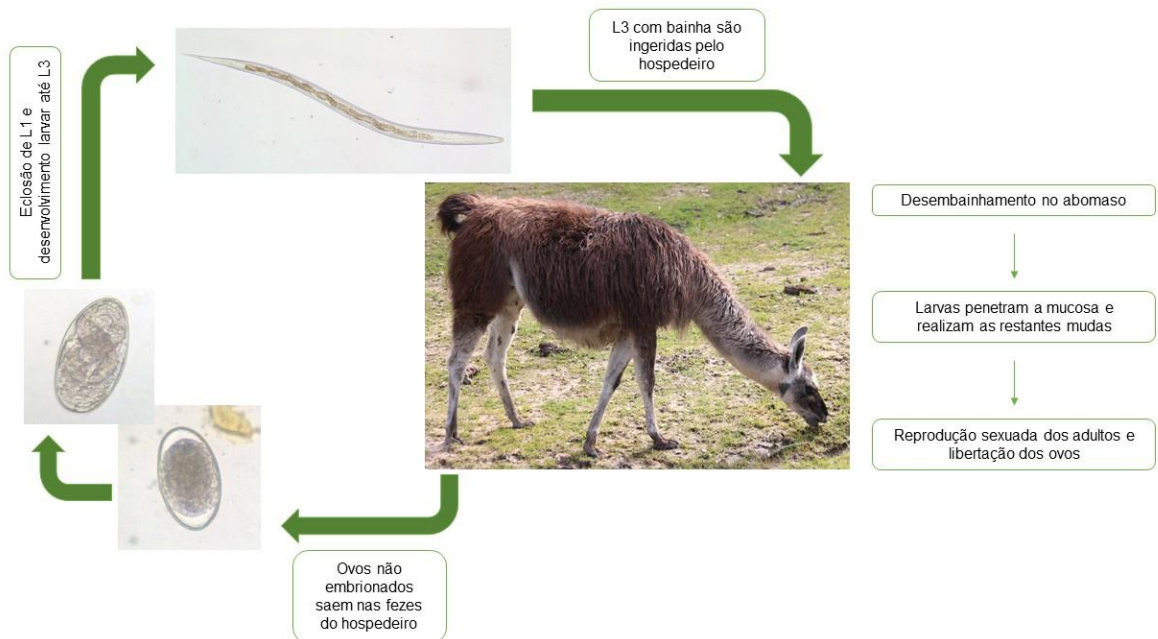
#### **Identificação**

Os adultos desta espécie apresentam corpo capilariforme e afilado nas extremidades, não ultrapassando os 8 mm de comprimento. Possuem cor castanha-avermelhada, devido à sua ação hematófaga, e a cápsula bucal é muito pouco proeminente. Nos machos, as espículas são desiguais entre si, curtas, espessas e torcidas. Nas fêmeas, não existe aba supravulvar e os ovos encontram-se dispostos longitudinalmente em fileiras. Os ovos, típicos de estrongilídeos, apresentam superfície lisa e forma elipsoidal (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016). As L3 de *T. axei* apresentam uma cauda da bainha sem filamento e de reduzidas dimensões (Van Wyk et al., 2004).

#### **Ciclo de Vida**

Este nematode possui um ciclo de vida direto (Figura 4). Os ovos são libertados nas fezes e as L3 com bainha constituem a fase infetante. Após ingestão, o desembainhamento dá-se no abomaso e as larvas penetram a mucosa, onde realizam as restantes mudas até atingirem a fase adulta. Os ovos embrionados e as L3 de *T. axei* conseguem resistir no ambiente às condições adversas (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016).

**Figura 4 - Ciclo de vida de *Trichostrongylus axei* (original)**



### Sinais Clínicos e Lesões

Apesar das infeções por *T. axei* serem, na maioria das vezes, caracterizadas pela ausência de sinais clínicos, na presença de elevadas cargas parasitárias podem surgir diarreias líquidas associadas a uma grande perda de peso (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016). Uma lã, parasitada por *Teladorsagia* spp. e *T. axei*, apresentou à necrópsia lesões de gastrite, nomeadamente, nódulos umbilicados que se aglutinavam de forma difusa e mucosa irregularmente espessa, como resultado da hiperplasia da células epiteliais glandulares (Rickard, 1993).

### Diagnóstico

O diagnóstico pode ser baseado nos sinais clínicos e, se possível, nas lesões visíveis aquando do exame *post-mortem*. A identificação dos ovos através de técnicas coprológicas é importante, mas é necessário a realização de culturas fecais e extração de larvas L3 para a respetiva identificação (Taylor et al., 2016; Van Wyk et al., 2004).

## **Terapêutica**

O tratamento da tricostrongilose baseia-se na administração de anti-helmínticos. Nos ruminantes silvestres utilizam-se os mesmos fármacos (febendazol, albendazol, ivermectina, doramectina, moxidectina, eprinomectina, levamisol e morantel) e doses semelhantes às usadas nos domésticos. Em lamas, aconselha-se a administração de doses elevadas, com repetição 3 semanas depois (Bowman, 2014; Bravo, 2015). Avaliações realizadas à eficácia de anti-helmínticos em ruminantes silvestres mantidos em cativeiro revelaram resistências ao febendazol (Goossens, Dorny, Vercammen, et al., 2005) e ao levamisol (Young et al., 2000) em certas populações de tricostrongilídeos.

### **1.2.2. *Cyathostomum* spp.**

O género *Cyathostomum* parasita o intestino grosso dos equinos domésticos e selvagens, mas também de outras espécies como elefantes, suínos, marsupiais e tartarugas. Inclui-se no Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Strongylida, Superfamília Strongyloidea, Família Strongylidae, Subfamília Cyathostominae, pelo que pertence ao grupo dos ciatostomíneos, do qual mais de 40 espécies parasitam o cavalo. É bastante comum observar-se 10 a 20 destas espécies a infetar um único hospedeiro ao mesmo tempo (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016).

## **Identificação**

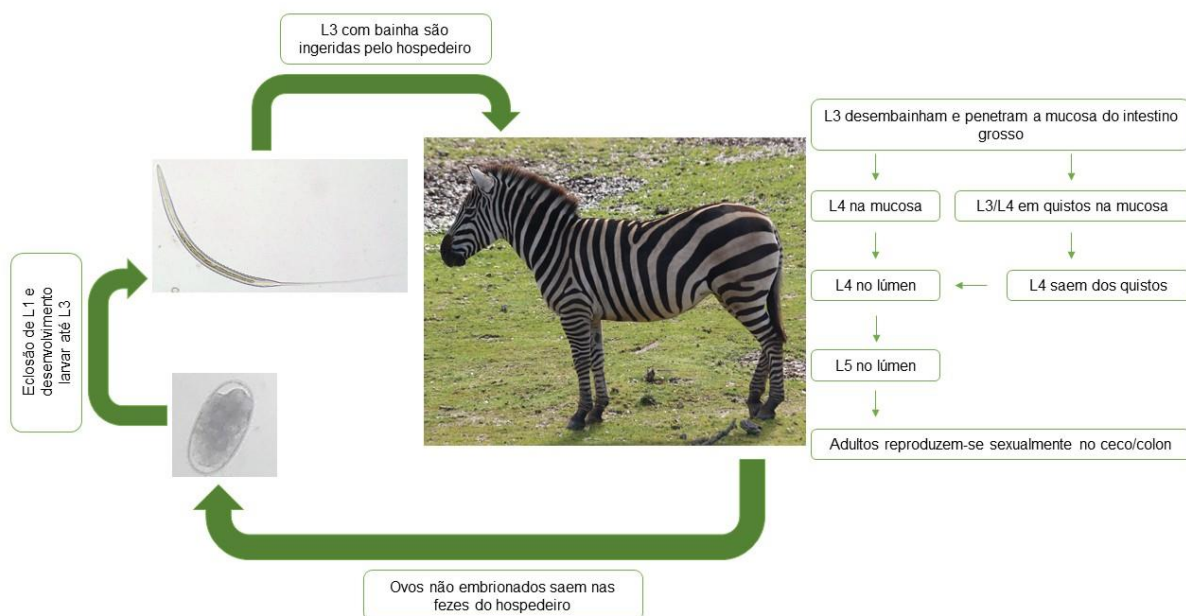
Os “pequenos estrôngilos” não ultrapassam os 25 mm de comprimento na sua forma adulta, variando a sua cor entre branco e vermelho escuro (Taylor et al., 2016). Apresentam uma cápsula bucal de menores dimensões que os “grandes estrôngilos” e possuem distintas coroas radiadas internas e externas (Bowman, 2014). Os ovos são indistinguíveis entre as diferentes espécies e a identificação das L3 baseia-se no número, forma e arranjo das células intestinais, bem como no comprimento total da larva (Madeira de Carvalho, Fazendeiro, & Afonso-Roque, 2008).

## **Ciclo de Vida**

Tal como a maioria dos nematodes da família Strongylidae, os ciatostomíneos apresentam um ciclo de vida direto (Figura 5). Após a libertação dos ovos nas fezes, o desenvolvimento até L3 (forma infetante) varia com a temperatura, sendo de 3 dias em climas quentes. As L3 adquirem uma membrana protetora que lhes permite sobreviver em condições desfavoráveis, permanecendo assim longos períodos na pastagem. Quando são ingeridas, desembainham e invadem a mucosa do intestino grosso onde enquistam por períodos que podem ir até 2 anos. Em climas temperados, as L3 enquistam durante os meses frios e emergem já na forma de L4 assim que a temperatura começa a aumentar na Primavera. Quando não se dá o

enquistamento das L3, dá-se a sua maturação até à forma adulta e há libertação de ovos cerca de 5 a 6 semanas após a infeção (Love & Duncan, 1992 citado por Corning, 2009; Proudman & Matthews, 2000 citado por Corning, 2009).

**Figura 5 - Ciclo de vida de *Cyathostomum* spp. (original)**



### Sinais Clínicos e Lesões

A maioria dos sinais clínicos apresentados são comuns aos das restantes infeções por nematodes: letargia, anemia, diarreia e perda de peso. No entanto, podem haver lesões mais graves. No início da infeção, as L3 provocam danos na mucosa e submucosa que podem levar a uma diminuição do metabolismo nutricional. É quando se dá o desenquistamento em massa das larvas de 4º estadio (L4) que os danos mais graves se verificam: a parede do intestino fica seriamente danificada, resultando em diarreias e cólicas intensas e taxas de mortalidade que podem ir até aos 50%. Apesar de haver uma maior vulnerabilidade à doença por parte dos potros, os sinais clínicos podem verificar-se em cavalos de qualquer idade (Corning, 2009; Taylor et al., 2016).

### Diagnóstico

O diagnóstico através dos sinais clínicos é difícil já que são comuns a outras parasitoses. Muitas vezes só é possível fazê-lo *post-mortem* através das lesões e das formas parasitárias adultas encontradas durante a necrópsia (Corning, 2009). Através de coproculturas e identificação das L3 é possível, apesar de difícil, fazer um diagnóstico até ao género e, por vezes, até à espécie (Madeira de Carvalho et al., 2008).

## Terapêutica

Existem três classes de anti-helmínticos disponíveis para controlo de ciatostomíneos em equídeos: os benzimidazóis, como o febendazol e o oxfendazol, as tetrahidropirimidinas, como é o caso dos sais de pirantel, e as lactonas macrocíclicas, ivermectina e moxidectina. Este último grupo tem sido cada vez mais utilizado devido à sua potência, espectro de ação, segurança e pouca evidência de resistências em ciatostomíneos (Corning, 2009). Em Itália, um estudo realizado num Parque Zoológico testou a eficácia de uma ração formulada com ivermectina na sua população de zebras. Após os 10 dias de tratamento, as contagens mantiveram-se baixas até aos 78 dias pós tratamento. À exceção de uma única amostra positiva antes dos 78 dias, os resultados demonstraram uma eficácia de 100% no controlo da ciatostomíase (Lia et al., 2010). Resistências aos benzimidazóis já foram detetadas em cavalos na Europa (Kuzmina & Kharchenko, 2008; Traversa et al., 2009).

### 1.2.3. *Parascaris* spp.

Os nematodes do género *Parascaris* (*P. equorum* e *P. univalens*) são parasitas específicos do intestino delgado dos equídeos, afetando principalmente potros. Pertencem ao Filo Nematoda, Classe Secernentea, Ordem Ascaridida, Superfamília Ascaridoidea, Família Ascarididae e apresenta distribuição cosmopolita (Taylor et al., 2016).

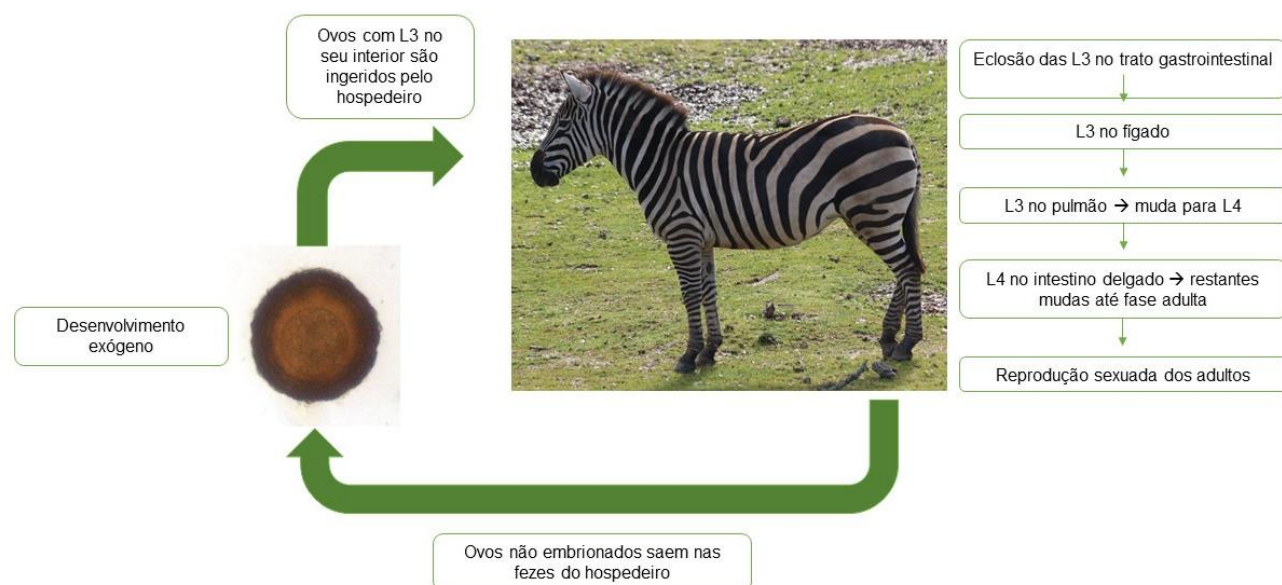
## Identificação

Os adultos de *Parascaris* spp. podem atingir 50 cm de comprimento, possuem uma boca com três lábios bem desenvolvidos e os machos apresentam a cauda ligeiramente curvada ventralmente com asa caudal pouco desenvolvida. Os ovos são redondos, de parede espessa, cor acastanhada e contém uma única célula quando libertados nas fezes (Bowman, 2014) (Taylor et al., 2016).

## Ciclo de Vida

O nematode *Parascaris* spp. apresenta um ciclo de vida direto (Figura 6). As fêmeas adultas libertam os ovos no intestino delgado que contaminam o meio ambiente através das fezes. Os ovos com uma L3 no seu interior constituem a fase infetante, sendo necessários cerca de 10 dias a uma temperatura de 25-35°C para que ocorra este desenvolvimento. Estes ovos são capazes de resistir até 10 anos no meio ambiente. Após a sua ingestão, dá-se a eclosão no trato gastrointestinal e as L3 migram pelo fígado e pulmão, onde mudam para L4, até regressarem novamente ao intestino. O restante desenvolvimento até à fase adulta prossegue no intestino delgado, sendo que o período de pré-patência dura entre 75 a 80 dias (Bowman, 2014; Clayton, 1986 citado por Reinemeyer, 2009).

**Figura 6** - Ciclo de vida de *Parascaris* spp. (original)



### Sinais Clínicos e Lesões

Durante a fase larvar migratória, os principais sinais clínicos são tosse frequente acompanhada de descargas nasais esverdeadas. Diminuição das taxas de crescimento, febre, anorexia e pelo baço também são sinais visíveis nesta fase. Eventualmente, os danos físicos provocados ao fígado e ao pulmão acabam por curar, mas dá-se uma redução crônica da capacidade funcional destes órgãos. Em infecções graves com grande quantidade de adultos no lúmen intestinal, são frequentes as enterites graves que alternam entre obstipação e diarreia (Bowman, 2014; Taylor et al., 2016).

### Diagnóstico

O parasita *Parascaris* spp. é um dos poucos nematodes que induz uma imunidade adquirida absoluta no seu hospedeiro. A maioria dos equinos torna-se imune no primeiro ano de vida, sendo difícil diagnosticar esta parasitose através de sinais clínicos em animais com mais de dois anos de idade (Reinemeyer, 2009). O diagnóstico definitivo é feito pela visualização dos ovos através de técnicas coprológicas (Taylor et al., 2016).

### Terapêutica

Piperazina, fenbendazol, pirantel, ivermectina, moxidectina e outros anti-helmínticos são usados contra as fases intestinais dos nematodes do género *Parascaris* (Bowman, 2014). Estudos em cavalos domésticos demonstram a presença de resistência às lactonas macrocíclicas em vários países do mundo (Craig, Diamond, Ferwerda, & Thompson, 2007; Lind & Christensson, 2009; Lyons, Tolliver, Ionita, & Collins, 2008; Schougaard & Nielsen, 2007; Slocombe, Gannes, & Lake, 2007; Veronesi, Fioretti, & Genchi, 2010).



## 2. Técnicas Coprológicas Quantitativas para o Diagnóstico de Nematodes Gastrointestinais em Zoos: McMaster e Mini-FLOTAC

A avaliação quantitativa da infecção por parasitas é necessária para medir, gerir e reduzir o risco de infecção em populações de animais selvagens e em cativeiro. Os métodos tradicionais de flutuação que têm por objetivo quantificar os ovos presentes nas fezes são bastante utilizados em medicina veterinária, tanto em animais domésticos como nas espécies exóticas e selvagens. Estas técnicas permitem a contagem do número de ovos fecais, que se traduz em ovos por grama de fezes (OPG), sendo esta apenas uma estimativa da carga parasitária total (Lynsdale et al., 2015). Esta quantificação permite perceber qual o impacto clínico da infecção e se existe ou não a necessidade de controlo terapêutico (Modrý et al., 2017), sendo por isso uma importante ferramenta na prevenção de resistências aos anti-helmínticos.

O método mais simples e mais utilizado em todo o mundo para a contagem de OPG é a técnica de McMaster (Modrý et al., 2017). No entanto, novas técnicas com maior sensibilidade têm surgido nos últimos anos como é o caso do FLOTAC e Mini-FLOTAC. Sendo a primeira uma técnica que requer várias centrifugações e uso de material de laboratório específico, o Mini-FLOTAC foi uma evolução necessária que permite um uso mais simples da técnica sem recurso a material específico (Cringoli et al., 2017, 2010).

Existem três fatores importantes que afetam as contagens de ovos fecais. Estes são o limite de deteção da técnica, ou seja, a **sensibilidade** (quando esta é baixa pode dar origem a falsos negativos nos casos em que a carga parasitária é baixa), o quão perto do valor real está a contagem obtida pela técnica, ou seja, a **exatidão**, e o nível de variabilidade associado a cada técnica, ou seja, a **precisão**. Estudos comparando as diferentes técnicas referidas acima têm verificado uma maior sensibilidade, exatidão e precisão do Mini-FLOTAC em relação ao McMaster (Barda et al., 2014; Dias de Castro et al., 2017; Noel, Scare, Bellaw, & Nielsen, 2017). A Tabela 2 apresenta as diferentes características e limitações das técnicas anteriormente referidas.

**Tabela 2** - Características das técnicas McMaster, Mini-FLOTAC e FLOTAC para o diagnóstico de nematodes gastrointestinais (adaptado de Cringoli et al., 2017)

Técnica	Desempenho do Diagnóstico			Desempenho da Técnica			Limitações
	Sensibilidade	Exatidão	Precisão	Custo	Tempo	Equipamento	
McMaster	Média	Baixa	Baixa	Caro	Médio	Equipamento de laboratório básico	Diagnóstico de protozoários limitado a coccídeos
Mini-FLOTAC	Alta	Alta	Alta	Caro	Médio	Equipamento de laboratório básico	Deteção de alguns parasitas (trematodes) requer centrifugação
FLOTAC	Muito alta	Muito alta	Muito alta	Barato	Demorado	Equipamento de laboratório específico	Requer várias centrifugações com dois tipos diferentes de centrífugas

O FLOTAC e o Mini-FLOTAC já têm sido utilizados para detetar parasitoses em animais selvagens em cativeiro e também de vida livre (Alvarado-Villalobos et al., 2017; Maesano et al., 2014). Ambos os estudos referem estas técnicas como métodos promissores no diagnóstico de infeções parasitárias em espécies selvagens.

### 3. Controlo Integrado de Nematodes Gastrointestinais em Zoos

O controlo de nematodes em Parques Zoológicos baseia-se sobretudo na administração de anti-helmínticos. No entanto, o uso repetido destes fármacos leva ao aparecimento de resistências (Garretson, Hammond, Craig, & Holman, 2009; Isaza, Courtney, & Kollias, 1995; Young et al., 2000) e ao aumento da eliminação de metabolitos tóxicos para o ambiente através da urina e fezes dos animais (Fernández, 1998 citado por Madeira de Carvalho et al., 2016). Torna-se assim imprescindível a aplicação duma abordagem multifatorial no que toca à prevenção e tratamento destas parasitoses. Deste modo, para além do recurso a fármacos anti-helmínticos, um programa de controlo eficaz deve incluir: rastreios parasitários de rotina, testes de sensibilidade larvar aos anti-helmínticos e métodos de controlo alternativos (não químicos) (Wolfe, 2015).

Estes métodos de controlo alternativo atuam de modo complementar ao tratamento químico, permitindo diminuir os casos de resistência e manter as cargas parasitárias em níveis aceitáveis. A higiene cuidada das instalações, boa gestão das pastagens, nutrição adequada,

suplementação com cobre, uso de extratos de plantas ou o controlo biológico através de fungos nematófagos são exemplos de medidas alternativas aplicáveis em Zoos e que atuam não só nos parasitas, mas também no hospedeiro e no próprio ambiente (Arroyo Balán, 2017; Bowman, 2014; Fontenot & Miller, 2012; Taylor et al., 2016).

O terreno onde são colocados os animais, assim como o tipo de instalação em que estes se encontram são importantes fatores que vão influenciar a sua suscetibilidade aos agentes parasitários. Haverá um maior risco de sofrerem uma infeção parasitária se estiverem em terras previamente ocupadas por animais domésticos (Cunningham, 1996) e se forem mantidos em pastagem, já que os terrenos de relva e areia podem constituir reservatórios para as diferentes formas parasitárias (Goossens, Dorny, Boomker, et al., 2005). Para além disto, uma alta densidade de animais na instalação facilita a disseminação dos parasitas e a transmissão destes a outras espécies de hospedeiros (Garijo, Ortiz, & Ruiz de Ibáñez, 2004). É assim fácil de perceber que simples ações como a remoção das fezes diariamente, a rotação das pastagens, a diminuição do número de animais por instalação e o respeito pelos períodos de quarentena possam ser bastante eficazes em reduzir a transmissão parasitária em ambiente de zoo (Bowman, 2014; Fontenot & Miller, 2012; Taylor et al., 2016).

A alimentação e a nutrição dos animais podem contribuir para o seu parasitismo, principalmente se forem alimentados com forragem contaminada por outros animais (Madeira de Carvalho et al., 2016), mas também caso estejam mal nutridos, o que os torna menos resistentes a uma possível infeção. Segundo Coop & Kyriazakis (2001), um aumento do consumo diário de proteína aumenta a capacidade do hospedeiro de controlar e resistir a uma infeção parasitária.

Suplementos de óxido de cobre administrados em *bolus* já demonstraram ser eficazes no controlo parasitário de ruminantes silvestres em cativeiro (Fontenot, Kinney-Moscona, Kaplan, & Miller, 2008). No entanto, é necessário cuidado pois administrações prolongadas podem provocar intoxicações aos animais (Burke & Miller, 2008).

Também extratos de plantas podem ser dados a animais para que atuem como anti-helmíntico, principalmente as que possuem taninos condensados bioativos (Fontenot & Miller, 2012). Por exemplo, a eficácia da administração da planta *Sericea lespedeza* já foi verificada em diversos estudos (Lange et al., 2006; Terrill et al., 2007, 2009).

A utilização de fungos nematófagos constitui uma medida de controlo biológico cuja eficácia reside na redução das formas infetantes presentes nas fezes e no ambiente. Uma vez que não atuam nos parasitas adultos, apenas devem ser usados como método complementar e não como substituto dos anti-helmínticos convencionais (Arroyo Balán, 2017).

### 3.1. Controlo Biológico

Regra geral, todas as espécies de animais são reguladas por outros organismos vivos que ocorrem naturalmente sem a manipulação do ser humano. A este fenómeno dá-se o nome de **Controlo Biológico Natural**, que não deve ser menosprezado, uma vez que sem antagonistas naturais muitas populações de parasitas aumentariam exponencialmente. O termo **Controlo Biológico**, propriamente dito, refere-se a situações em que o Homem utiliza antagonistas naturais para diminuir uma população de indivíduos que iriam provocar perdas à produção agrícola ou pecuária (Grønvold, Henriksen, Larsen, Nansen, & Wolstrup, 1996). O objetivo de uma estratégia de controlo biológico não é eliminar completamente a peste (neste caso, os parasitas), mas sim manter a população a um nível estável, no qual não provoque efeitos adversos nos indivíduos hospedeiros (Larsen, 2000).

Com o aumento das resistências aos anti-helmínticos, o controlo biológico de nematodes (principalmente através do uso de fungos nematófagos) tem sido alvo de vários estudos ao longo dos últimos anos (Arias, Cazapal-Monteiro, Suárez, et al., 2013; Arroyo Balán, 2017; Cazapal-Monteiro, 2015; Cruz, 2015; W. Ferreira et al., 2017; Hernández Malagón, 2014; Madeira de Carvalho, Gillespie, Serra, Bernardo, & Farrim, 2007; Silva, Araújo, Braga, Alves, & Frassy, 2010; Waller, Knox, & Faedo, 2001). No caso dos Parques Zoológicos também existe a procura por este método alternativo, tendo sido desenvolvidos vários estudos que verificaram a eficácia do controlo biológico em animais selvagens mantidos em cativeiro (Arias, Cazapal-Monteiro, Valderrábano, et al., 2013; Cazapal-Monteiro et al., 2014; Hernández, Arroyo, Silva, & Palomero, 2018; Miguélez Riádigos et al., 2014; Palomero et al., 2018).

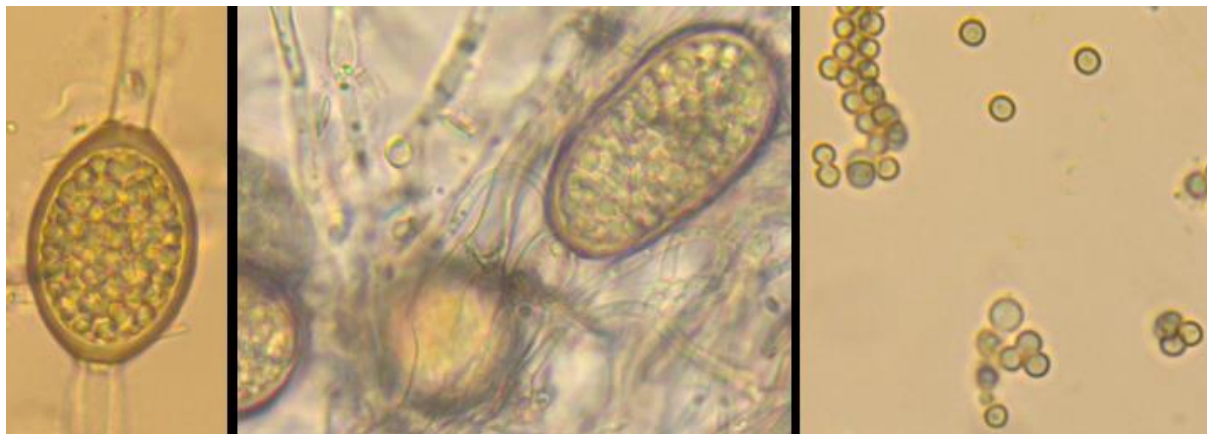
#### 3.1.1. Fungos Nematófagos

Os fungos nematófagos são organismos vivos eucariotas, que se podem encontrar em diferentes tipos de ambiente. Possuem uma parede celular definida, que contém quitina, mas não clorofila nem celulose. Ao não possuírem clorofila, a sua alimentação consiste principalmente em matéria orgânica em decomposição. No entanto, apesar de serem saprófitos, podem utilizar outros organismos como fonte de nutrientes, caso haja oportunidade e/ou necessidade (Arroyo Balán, 2017; Larsen, Nansen, Grønvold, Wolstrup, & Henriksen, 1997).

Os fungos são normalmente constituídos por estruturas cilíndricas e filamentosas denominadas por hifas (que irão compor o micélio e a rede micelar) e reproduzem-se assexuadamente através da formação de esporos ou conídios (Figura 7). Em condições ambientais adversas, a hifa poderá dar origem a formas de resistência, os clamidosporos.

Estes são semelhantes aos esporos, mas apresentam uma parede espessa e resistente e encontram-se dotados de reservas nutritivas (Larone, 2011 citado por Cruz, 2015).

**Figura 7** - Imagem microscópica de esporos provenientes de uma suspensão fúngica. À esquerda, clamidosporo de *D. flagrans* com uma hifa a desenvolver-se; Ao centro, conídios de *D. flagrans* incorporados no micélio; À direita, esporos de *M. circinelloides*. Ampliação: 122x (Cruz, 2015)



A primeira observação da existência de fungos nematófagos e do seu efeito em nematodes foi efetuada em 1888 por Zopf (Duddington, 1955, 1962), tendo sido descobertas mais de 200 espécies até hoje (Nordbring-Hertz, Jansson, & Tunlid, 2006). O Anexo 1 apresenta uma classificação taxonómica dos principais géneros de fungos nematófagos utilizados como controlo biológico.

O maior desafio da utilização destes fungos como agente de controlo biológico é a necessidade da sua presença no interior da matéria fecal do hospedeiro, de modo a que haja uma redução eficaz das formas infetantes nas fezes e, consequentemente na pastagem. Ainda assim, havendo presença dos fungos no meio ambiente, as fezes após serem emitidas são rapidamente colonizadas ou dá-se a ingestão dos fungos durante o pastoreio, sendo estes depois expulsos com as fezes (Larsen, 2000). É, então, fácil de perceber que no que toca ao controlo biológico não basta apenas encontrar isolados fúngicos com a capacidade de destruir nematodes, mas também capazes de resistir à passagem no trato gastrointestinal dos animais, de modo a poderem atuar diretamente nas formas parasitárias presentes nas suas fezes (Larsen, 1999).

Nos últimos anos, têm-se desenvolvido diversas formas de administração oral de fungos nematófagos que permitem a saída direta destes nas fezes dos animais (Sagüés, Purslow, et al., 2011): fungos embebidos em grãos de cereais (Waller, Knox, et al., 2001), misturados com os *premixes* alimentares (Arias, Cazapal-Monteiro, Valderrábano, et al., 2013; Cazapal-Monteiro et al., 2014), em blocos minerais ou energéticos (Sagüés, Fusé, et al., 2011; Waller, Knox, et al., 2001), através de dispositivos intraruminais de *bolus* de libertação controlada

(Waller, Faedo, & Ellis, 2001), em *pellets* nutricionais (Araújo, Sampaio, Vasconcellos, & Campos, 2000; Arroyo Balán, 2017; Arroyo Balán et al., 2016) ou em gelatinas (Evangelista, 2018).

Em certas situações pode ser mais complicada a administração de esporos fúngicos por via oral (nomeadamente animais selvagens em cativeiro), pelo que outra possibilidade é a sua distribuição em solução líquida diretamente sobre o solo. No Parque Zoológico “Marcelle Natureza”, em Lugo, Espanha, esta técnica foi utilizada com sucesso no terreno que servia de instalação a cinco antílopes (Miguélez Riádigos et al., 2014).

De acordo com o seu tipo de ação, os fungos nematófagos podem ser divididos em três grupos: **fungos predadores ou larvicidas**, que capturam as fases de vida livre usando estruturas especializadas, **fungos ovicidas**, que afetam ovos e oocistos (ou fêmeas adultas) ao penetrá-los com as suas hifas, e **fungos endoparasitas**, que infetam os nematodes através da adesão de esporos (Braga & Araújo, 2014; Nordbring-Hertz et al., 2006). Estes últimos não são normalmente utilizados num programa de controlo biológico devido ao número restrito de hospedeiros que possuem, inabilidade de crescer no solo e dependência de água tanto *in vitro* com *in vivo* (Stirling & West, 1991 citado por Braga & Araújo, 2014).

#### 3.1.1.1. Fungos Nematófagos Predadores

Os fungos predadores (ou larvicidas) são o maior e mais estudado grupo de fungos nematófagos, principalmente as espécies pertencentes aos géneros *Arthrobotrys*, *Duddingtonia* e *Monacrosporium* (Anexo 1). A sua principal característica é a produção de armadilhas através de diferentes mecanismos: anéis constritivos (ativos) ou não constritivos (passivos), hifas adesivas não diferenciadas, redes tridimensionais (através da anastomose de ramificações das hifas), ramificações adesivas (que se podem unir entre si e formar redes adesivas) e nódulos adesivos (Braga & Araújo, 2014). Após o aprisionamento do nematode através de um destes métodos, as hifas penetram a sua cutícula, preenchendo o seu interior e digerindo-o (Grønvold, Henriksen, et al., 1996).

A captura e destruição dos nematodes pelas hifas adesivas divide-se em quatro fases: **atração** (os nematodes e larvas são atraídos para a rede de hifas através de compostos libertados pelo micélio), **adesão** (momento em que o parasita fica aprisionado na rede), **penetração** (quando a hifa penetra a cutícula através da atividade de enzimas hidrolíticas e por pressão mecânica) e, finalmente, **digestão e armazenamento dos nutrientes** (Nordbring-Hertz et al. 2006 citado por Cruz, 2015).

No caso das hifas que capturam os nematodes através de anéis constritores, o processo realiza-se de forma distinta. Quando estes anéis sentem o movimento do nematode, ocorre uma resposta nas células que constituem o anel. Esta resposta provoca a abertura de canais que permitem a entrada de água para dentro das células, o que, consequentemente, leva a um aumento generalizado do volume das mesmas, conduzindo ao aprisionamento do nematode. De seguida, dá-se a penetração da cutícula pelas hifas e o desenvolvimento destas no interior do parasita (Bordbring-Hertz et al., 2006 citado por Cruz, 2015).

#### **3.1.1.1.1. *Duddingtonia flagrans***

*Duddingtonia flagrans* (Duddington, 1949) é, atualmente, a espécie de fungos nematófagos predadores mais estudada (Tabela 3) e com as melhores perspetivas de ser utilizada no futuro como principal método de controlo biológico (Braga & Araújo, 2014; Cazapal-Monteiro, 2015; Larsen, 2000). Isto deve-se não só à facilidade de ser multiplicada em laboratório (pelo seu carácter saprófito que permite o isolamento e manutenção em culturas puras) (Arroyo Balán, 2017), mas principalmente à competência que tem para atravessar o trato gastrointestinal de várias espécies, mantendo a capacidade de germinar nas fezes e reduzir o número de larvas infetantes. Esta resistência existe porque os clamidosporos de *D. flagrans* (Figura 8) possuem uma parede bastante espessa que lhes permite tolerar condições extremas (Grønvold et al., 1993; Larsen, 1999). Estudos recentes já demonstraram que os clamidosporos resistem também aos tratamentos para produção de *pellets* nutricionais (Arroyo Balán, 2017) e ainda aos processos de liofilização (Evangelista, 2018; Santurio et al., 2009) Para além disto, *D. flagrans* produz uma grande quantidade de conídios, o que lhe permite multiplicar-se nas fezes num curto período de tempo (Grønvold et al., 1993).

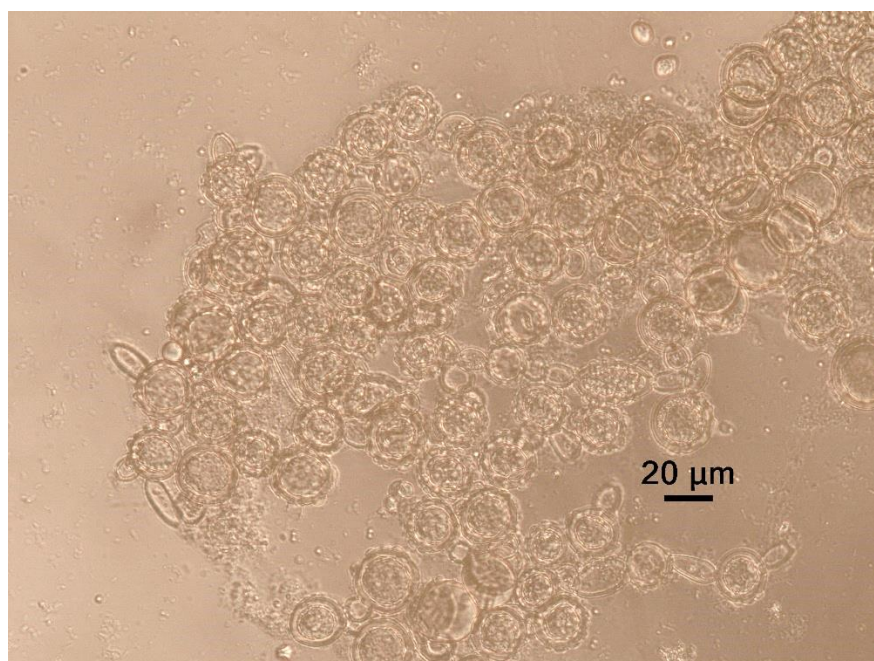
**Tabela 3** - Estudos que demonstram a eficácia de *Duddingtonia flagrans* em diferentes espécies de animais e respetivos nematodes

Animal	Parasita	Referência
Equinos	Cyathostominae	M. Arias et al., 2013
	Strongylinae	Fabio Ribeiro Braga et al., 2009
	<i>Strongyloides westeri</i>	S. R. Ferreira et al., 2012
		Madeira de Carvalho et al., 2007
Bovinos	Trichostrongylidae	Assis et al., 2012
	Strongylidae	Bañolas et a., 2008
Caprinos	Trichostrongylidae	Chartier & Pors, 2003
	Strongylidae	Vilela et al., 2012
Ovinos	Trichostrongylidae	Cazapal-Monteiro et al., 2014
	Strongylidae	W. Ferreira et al., 2017
		Mendoza-De Gives et al., 2006
Antílopes	Trichostrongylidae	Miguélez Riádigos et al., 2014
	Strongylidae	
Suínos		Cruz, 2015
	<i>Oesophagostomum</i> spp.	Facchini Rodrigues et al., 2018
	<i>Hyostrogylus rubidus</i>	Nansen et al., 1996
Canídeos	<i>Angiostrongylus vasorum</i>	Braga, Carvalho, et al., 2009
	<i>Ancylostoma</i> spp.	Maciel et al., 2010

O processo de formação do micélio inicia-se a partir dos esporos (Figura 8). Primeiro, formam-se as hifas germinativas, cujos ramos irão formar anastomoses com outras hifas, o que permite a formação dos anéis e das redes tridimensionais que aprisionam as larvas de nematodes (Grønvold, Nansen, et al., 1996). Assim que estas entram em contacto com a rede fúngica (as “armadilhas” do fungo, do inglês *nematode trapping fungi*), esta penetra a sua cutícula, não só mecanicamente, mas através da produção de diversas enzimas (proteases e quitinases) que paralisam a larva e auxiliam na digestão da mesma pelo fungo (Braga et al., 2015).



**Figura 8** - Clamidosporos de *Duddingtonia flagrans* (original)



A temperatura apresenta uma grande influência no crescimento e desenvolvimento das “armadilhas” de *Duddingtonia flagrans*. Morgan et al. (1997) verificaram que o crescimento máximo se dava entre os 25 e os 33°C e o aprisionamento através da formação de “armadilhas” era melhor entre os 25 e os 28°C. Outros fatores como a luz, a humidade, o pH, a presença de oxigénio e o contato com larvas de nematodes ou os seus antígenos podem influenciar o seu desenvolvimento e a formação de elementos de captura (Grønvold et al., 1999; Madeira de Carvalho et al., 2007). Para além dos nematodes, também a presença de trematodes estimula a produção de “armadilhas” e de clamidosporos (Arias, Suárez, Cazapal-Monteiro, Francisco, López-Arellano, et al., 2013).

Os possíveis efeitos de *Duddingtonia flagrans* em nematodes não parasitas e no próprio solo foram observados, não se verificando efeitos negativos, para além de que *D. flagrans* não persiste mais de 2 meses no solo após a saída nas fezes (Saumell et al., 2016). Até à data não foram encontrados efeitos negativos para os animais provocados pela utilização deste fungo. Madeira De Carvalho et al. (2011) verificaram que a administração de *D. flagrans* não provocava efeitos indesejados nos parâmetros vitais dos equinos em estudo.

Na Austrália, foi recentemente registado o primeiro produto veterinário com *Duddingtonia flagrans* na sua composição. BioWorma® consiste num alimento granulado contendo *D. flagrans* estirpe IAH 1297 numa concentração de, pelo menos, 500000 clamidosporos/g (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority [APVMA], 2018).

### 3.1.1.2. Fungos Nematófagos Ovicidas

Os fungos ovicidas são espécies oportunistas que se alimentam de ovos e oocistos de parasitas, penetrando-os e alimentando-se do embrião. A maior parte destes é saprófita, pelo que se conseguem desenvolver sem a presença de formas parasitárias (Braga & Araújo, 2014; Sagüés, Purslow, et al., 2011). Atualmente, as espécies mais estudadas e usadas pertencem aos géneros *Mucor*, *Pochonia*, *Paecilomyces* e *Trichoderma* (Anexo 1) (Arroyo Balán, 2017; Braga & Araújo, 2014; Cazapal-Monteiro et al., 2015; Cruz, 2015; Hernández Malagón, 2014). A maioria dos ovos de nematodes desenvolve-se rapidamente até larvas, o que não permite aos fungos atuar e, consequentemente, ser eficientes. No entanto, certos géneros de nematodes, como por exemplo *Ascaris* e *Trichuris*, não desenvolvem larvas no meio ambiente, o que os torna mais suscetíveis à ação de fungos ovicidas (Cortiñas et al., 2015; Silva et al., 2011, 2010).

O desenvolvimento dos fungos e atividade destes sobre os ovos desenrolam-se em quatro fases: **contato**, **adesão**, **penetração** e, **finalmente**, **libertação**.

Inicialmente, dá-se o desenvolvimento do micélio na presença de ovos. Em alguns casos, forma-se uma estrutura no extremo de algumas hifas laterais denominada *apressorium*, que irá contactar com a superfície do ovo. A área de contato entre a hifa e a superfície do ovo, nesta fase, é bastante suave (Hernández Malagón et al., 2017; Lýsek & Stěrba, 1991). De seguida, o *apressorium* da hifa adere à cápsula do ovo, sendo que só quando adere perpendicularmente à cápsula é que conseguirá penetrar o ovo. O mecanismo pelo qual se dá a penetração do ovo ainda não é totalmente conhecido, havendo uma relação entre a pressão física do *apressorium* e a produção de certas enzimas (Cazapal-Monteiro, 2015). Assim que o fungo penetra o ovo, este destrói todo o seu conteúdo, incluindo o embrião, e liberta para o exterior novas hifas que irão destruir outros ovos (Hernández Malagón et al., 2017; Lýsek & Stěrba, 1991).

Lýsek et al. (1982), de acordo com as alterações morfológicas provocadas nos ovos pelos fungos, estabeleceram os seguintes tipos de atividade ovicida:

Tipo 0: os ovos são viáveis e não são observadas alterações nos mesmos.

Tipo 1: existem aderências à cápsula do ovo, sem que este se encontre alterado.

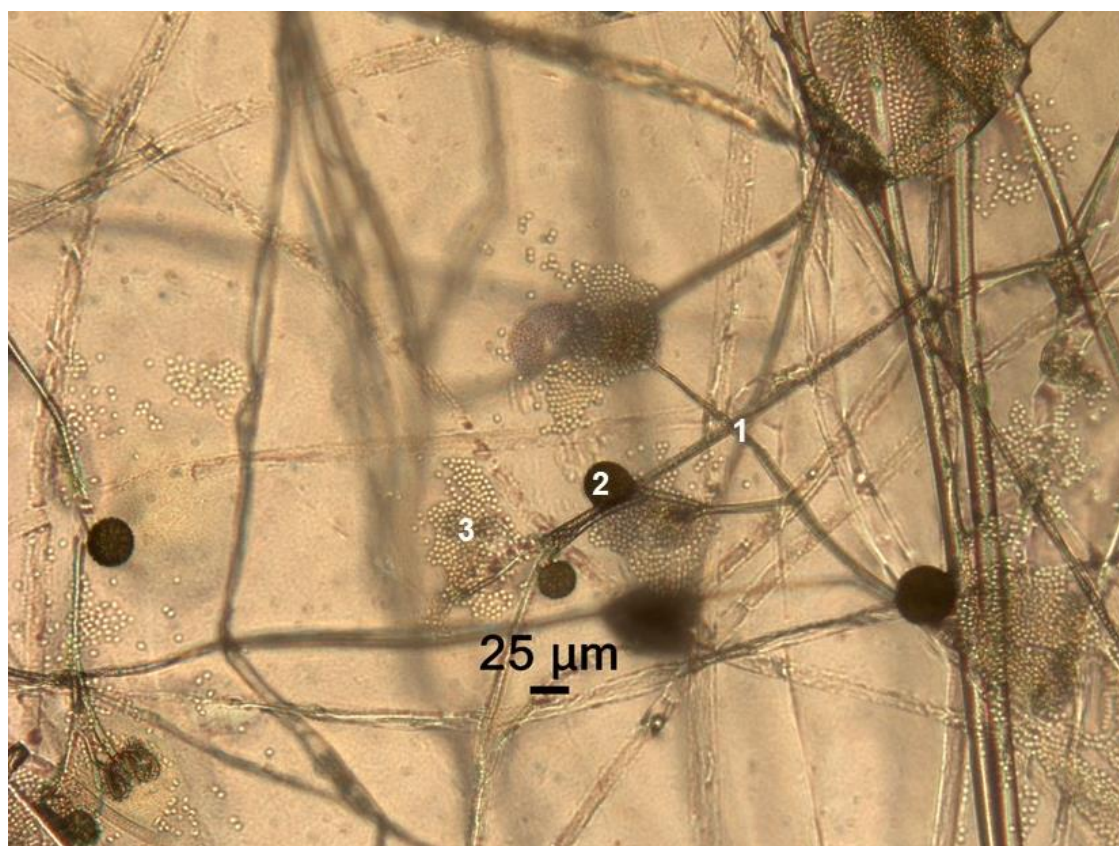
Tipo 2: a cápsula e o embrião encontram-se danificadas sem ter havido penetração (por ação enzimática).

Tipo 3: as hifas penetram o ovo e destroem o embrião.

### 3.1.1.2.1. *Mucor circinelloides*

*Mucor circinelloides* tem sido bastante estudado devido à sua capacidade para produzir biodiesel (Reis, Hu, & Zhang, 2011), mas só recentemente lhe tem sido dada importância como agente de controlo biológico, devido à sua atividade ovicida (Arias, Cazapal-Monteiro, Suárez, et al., 2013). O seu desenvolvimento dá-se através de reprodução assexuada ou sexuada, com a produção de hifas e esporângios (Figura 9) ou de zigosporos, respetivamente (C. H. Li et al., 2011; Raghukumar, 2017).

**Figura 9** - Hifas (1), esporângios (2) e esporos (3) de *Mucor circinelloides* (original)



Para além da sua ação em nematodes (Tabela 4), já foi demonstrada a eficácia de *M. circinelloides* em ovos de trematodes (Cortiñas et al., 2015; Hernández Malagón et al., 2017) e em oocistos de coccídeas (Cruz, 2015). Tal como *Duddingtonia flagrans*, tem a capacidade de sobreviver ao trato gastrointestinal dos animais (Cortiñas et al., 2015), bem como aos tratamentos industriais para a produção de *pellets* (Arroyo Balán et al., 2016) e à liofilização (Evangelista, 2018).

**Tabela 4** - Estudos que demonstram a eficácia de *Mucor circinelloides* em diferentes espécies de animais e respectivos nematodes

Animal	Parasita	Referência
Equinos	<i>Parascaris equorum</i>	Hernández Malagón, 2014
Camelídeos	<i>Trichuris</i> spp.	(Hernández, Arroyo, et al., 2018)
Suínos	<i>Ascaris suum</i>	Cortiñas et al., 2015 Hernández Malagón, 2014
Canídeos	<i>Toxocara canis</i>	Cruz, 2015 Hernández Malagón, 2014
Felinos	<i>Toxascaris leonina</i>	Hernández et al., 2018
Procionídeos	<i>Baylisascaris procyonis</i>	(Cazapal-Monteiro et al., 2015)

Apesar de ainda não terem sido reportados efeitos negativos resultantes da administração deste fungo a animais, *M. circinelloides* pode causar mucormicose em humanos imunodeprimidos (Ribes, Vanover-Sams, & Baker, 2000), pelo que deve ser manipulado com as medidas de proteção adequadas.

#### IV. OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi contribuir para uma melhor compreensão acerca dos parasitas que habitualmente infetam coleções de animais selvagens mantidos em cativeiro e dos métodos que temos ao nosso dispor para que possamos realizar um diagnóstico e controlo mais eficaz.

Assim, o presente trabalho focou-se no grupo dos mamíferos mantidos em cativeiro no Parque Zoológico “Monte Selvagem – Reserva Animal” e teve como objetivos:

- (1) Analisar amostras fecais de todos os mamíferos do parque de modo a identificar os parasitas presentes e verificar a prevalência de nematodes gastrointestinais neste grupo de animais;
- (2) Recolher amostras fecais em dois períodos distintos, Inverno e Primavera, de modo a poder comparar as contagens de ovos obtidas.
- (3) Utilizar duas técnicas coprológicas quantitativas de contagem de ovos fecais para cada amostra, McMaster e Mini-FLOTAC, de modo a poder compará-las através da avaliação da sua concordância;
- (4) Observar a eficácia, simulando condições *in vivo*, do fungo *Mucor circinelloides* sobre ovos de *Trichuris* spp., *Parascaris* spp. e estrongilídeos gastrointestinais presentes nas fezes dos animais do parque.
- (5) Observar a eficácia, simulando condições *in vivo*, do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre larvas de estrongilídeos gastrointestinais presentes nas fezes dos animais do parque.

## **V. MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Introdução ao Local e Espécies em Estudo**

O “Monte Selvagem – Reserva Animal” situa-se em Lavre, concelho de Montemor-o-Novo, e alberga cerca de 60 espécies num espaço com uma dimensão de 20 ha. Os animais encontram-se alojados em instalações onde apenas se encontram indivíduos da mesma espécie e instalações mistas onde diferentes espécies partilham o mesmo espaço. O presente trabalho foi realizado com o grupo dos mamíferos, focando-se maioritariamente nos primatas e ungulados selvagens, com destaque para as seguintes espécies: macaco-de-tarrafe (*Chlorocebus aethiops*), lama (*Lama glama*) e zebra (*Equus burchellii*). Os primatas encontravam-se alojados em instalações com zona interior, onde as fezes eram recolhidas diariamente e todas as superfícies eram limpas e desinfetadas diariamente, e zona exterior com vegetação, onde as fezes apenas eram recolhidas semanalmente. A maioria dos ungulados selvagens partilhava, juntamente com outras espécies de aves, uma instalação mista exterior com zonas de vegetação e alguns lagos e charcos. Devido às grandes dimensões deste terreno, a recolha diária de todas as fezes não era passível de ser realizada. O Anexo 2 descreve com maior pormenor todas as espécies de mamíferos presentes no parque, bem como os tipos de instalação e alimentação respetivos.

### **2. Colheita das Amostras**

As amostras fecais dos mamíferos selvagens do “Monte Selvagem – Reserva Animal” foram colhidas usando luvas, colocadas num saco de plástico com identificação da espécie e da data de colheita e mantidas em refrigeração.

As fezes eram colhidas do solo, tentando-se sempre que fossem o mais frescas possível. No caso das instalações individuais, eram recolhidas as fezes realizadas durante a noite logo na manhã seguinte. Na instalação mista onde existiam várias espécies de ungulados selvagens, as fezes eram recolhidas logo após a defecação do animal. Nos casos em que tal não era possível, a distinção entre as diferentes amostras fecais era efetuada com o auxílio dos tratadores.



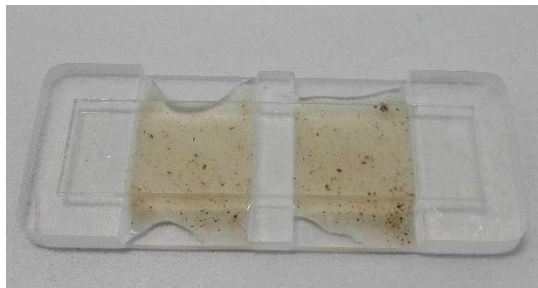
### 3. Técnicas Laboratoriais Coprológicas

#### 2.1. McMaster

A técnica de McMaster consiste num método coprológico de flutuação quantitativo usado para determinar o número de ovos ou oocistos presentes por grama de fezes (OPG) (Modrý et al., 2017). A proporção utilizada é de 1 g de amostra para 14 ml de solução, ou seja, 1 g para 15 ml de suspensão final e a sensibilidade do método com esta diluição é de 50 OPG.

Para este trabalho, pesavam-se 2 g de fezes (previamente homogeneizadas) ao qual se adicionavam 28 ml de solução salina saturada (NaCl s.g. 1200). Após nova homogeneização para distribuir as fezes por toda a solução, esta era filtrada para um novo recipiente. De seguida, procedia-se ao preenchimento da câmara de McMaster (Figura 10) com o auxílio de uma pipeta de Pasteur descartável. De forma a garantir a flutuação e adesão à grelha de todos os ovos, deixava-se repousar 2 a 3 minutos antes da observação ao microscópio ótico. O número de OPG é calculado através da seguinte fórmula:  $OPG = y \times 50$ , em que y corresponde ao número total de ovos contados dentro dos limites de ambas as câmaras (Madeira de Carvalho, 2001).

**Figura 10** - Câmara de McMaster (original)



#### 2.2. Mini-FLOTAC

**Figura 11** - Mini-FLOTAC (1) e Fill-FLOTAC (2) (original)



O Mini-FLOTAC (Figura 11) é uma técnica coprológica quantitativa que combina um método de flutuação com uma translação. Consiste num aparelho com duas câmaras, em forma de disco e é constituído por dois componentes principais (a base e o disco de leitura) e dois acessórios (a chave e o adaptador para leitura no microscópio). É recomendado que o Mini-FLOTAC seja usado em conjunto com o Fill-Flotac (Figura 11), um recipiente graduado com um coletor de fezes e um filtro já incorporados. Este possui duas versões: o Fill-FLOTAC 2, no qual o contentor permite que se coloquem até 2 g de fezes, usado para animais de companhia e humanos, e o Fill-FLOTAC 5, que leva até 5 g, usado para animais de produção (Cringoli et al., 2017).

Para esta técnica são utilizadas duas soluções: solução saturada de sódio (NaCl s.g. 1200), ideal para o diagnóstico de nematodes e cestodes, e solução saturada de zinco (ZnSO<sub>4</sub> s.g. 1350), para o diagnóstico de protozoários e trematodes (Maurelli, Rinaldi, & Cringoli, 2016). No presente trabalho foram utilizadas as duas soluções durante o rastreio inicial e apenas a solução salina durante o restante estudo.

A sensibilidade da técnica e, conseqüentemente, o fator de multiplicação, variam com a diluição utilizada que é diferente consoante a espécie em causa. Foi utilizada uma diluição de 1:10 para pequenos carnívoros e grandes herbívoros (sensibilidade de 5 OPG) e de 1:20 para primatas e restantes animais (sensibilidade de 10 OPG) (Parassitologia Veterinaria, 2018).

Para a realização deste trabalho, a solução saturada era adicionada ao recipiente graduado do Fill-FLOTAC em quantidades que variam com o fator de diluição e com a quantidade de fezes utilizada (18 ml no caso dos carnívoros, 45 ml para os grandes herbívoros e 38 ml no caso dos primatas e restantes animais). Seguidamente, a amostra era colocada no coletor do aparelho até o preencher totalmente e era homogeneizada juntamente com a solução através de movimentos rotativos e verticais do coletor. Uma ponta de pipeta era acoplada ao equipamento, o que permitia o preenchimento das câmaras do Mini-FLOTAC diretamente a partir do recipiente do Fill-FLOTAC. De modo a que todos os ovos flutuassem esperava-se 10 minutos até se girar o disco de leitura para observação e contagem ao microscópio ótico (Cringoli et al., 2017). O número de OPG é calculado através da seguinte fórmula:

**OPG** =  $y \times f.m.$ , em que y corresponde ao número total de ovos contados e o fator de multiplicação (f.m.) se calcula através da divisão entre o denominador do rácio de diluição e o volume total das duas câmaras (2ml) (Parassitologia Veterinaria, 2018).

### **2.3. Baermann**

O método de Baermann tem como objetivo a extração de larvas L1 de parasitas pulmonares (a partir de fezes frescas) ou de L3 de estrongilídeos gastrointestinais (após coprocultura), utilizando o princípio de que estas não se conseguem deslocar contra a gravidade acabando por sedimentar no fundo do aparelho utilizado (Bowman, 2014).

No presente trabalho, o uso desta técnica tinha como objetivo a identificação e quantificação das L3 de estrongilídeos gastrointestinais presentes ao fim de 4 semanas em fezes mantidas à temperatura ambiente em condições naturais. Para tal foram utilizados 8 g de fezes envoltas em gaze que, distintamente do referido por Taylor et al. (2016) foram colocadas num copo cónico com água (Figura 12) e não no aparelho com funil e torneira. As amostras foram então deixadas a repousar durante um período de 24 horas após a colocação em água. Passado este tempo, a gaze com as fezes foi retirada da água e foi descartado o sobrenadante, de modo a ficar uma quantidade de cerca de 2 ml no copo. Por fim, foi retirada uma alíquota de 100 µl com o auxílio de uma micropipeta e colocada entre lâmina e lamela para observação



ao microscópio ótico. Para cada amostra foram contadas 5 alíquotas. O valor de total de L3 em cada uma das amostras foi obtido através da multiplicação do total de L3 contadas nas 5 alíquotas por 4. O número de larvas por grama de fezes (LPG) foi calculado através da seguinte fórmula (Madeira de Carvalho, 2001):

$$LPG = \frac{L3 \text{ obtidas através do método de Baermann}}{\text{peso da amostra de fezes utilizada}}$$

**Figura 12** - Método de Baermann modificado (original)



Para a identificação das L3 de nematodes gastrointestinais foram utilizadas chaves dicotômicas de equídeos, no caso das fezes de zebra (Lichtenfels et al., 2008; Madeira de Carvalho et al., 2008) e de ruminantes, no caso das fezes de lama (Van Wyk et al., 2004), analisando-se a presença ou ausência de bainha, o número de células intestinais e o comprimento total da larva e da cauda.

### 3. Suspensões Fúngicas

As suspensões fúngicas utilizadas foram cedidas pelo grupo COPAR, Faculdade de Veterinária de Lugo, Universidade de Santiago de Compostela, Espanha. Estas consistem num meio líquido (COPFr – patent PCT/ES2014/070110), composto por um litro de água destilada, por 500 ml de caldo de galinha comercial, 0,423 mg de proteína recombinante do tegumento de *Fasciola hepatica* (FhrAPS) e 12,5 g de trigo (*Triticum aestivum*), que contém esporos de *Duddingtonia flagrans* (CECT 20823) e/ou *Mucor circinelloides* (CECT 20824) (Arias, Cazapal-Monteiro, Suárez, et al., 2013; Evangelista, 2018).

#### 3.1. Contagem da Concentração de Esporos

Antes de se proceder à contagem de esporos numa suspensão fúngica é necessário garantir a distribuição homogênea dos fungos pela mesma, pelo que é necessário agitar o recipiente onde estiver armazenada. As contagens devem ser sempre feitas em duplicado, de maneira a que o valor médio de concentração obtido esteja o mais perto possível do valor real (Cruz, 2015).

Para se verificar a concentração de esporos numa suspensão com *D. flagrans*, foi retirada uma alíquota de 50 µl e colocada entre lâmina e lamela. Após contagem dos conídios e clamidosporos ao microscópico óptico, o valor obtido foi multiplicado por 20 de modo a obter o número de esporos/ml (Cruz, 2015).

No caso de *M. circinelloides*, é necessário recorrer a uma câmara de Neubauer (Figura 13) e ampliações de 100 ou 200x, devido à grande quantidade de esporos produzidos e ao seu reduzido tamanho. A contagem foi realizada em 16 quadrados, preferencialmente não contíguos entre si, mas sim distribuídos aleatoriamente pela quadrícula, para minimizar o impacto das flutuações estatísticas e obter um resultado mais significativo. Tendo em conta que 16 quadrados correspondem a 0,1 µl e 1000 µl = 1 ml, basta multiplicar o número de esporos contabilizados nos 16 quadrados e multiplicar este valor por 10000 para se obter a concentração do fungo em esporos/ml (Hernández Malagón, 2014).

**Figura 13** - Colocação de uma alíquota de suspensão fúngica com *M. circinelloides* numa câmara de Neubauer (original)



#### 4. Ensaio em Caixas

Com o objetivo de avaliar o efeito dos fungos nematófagos em ovos e larvas de nematodes gastrointestinais foi realizado um ensaio em caixas tentando recriar as condições naturais a que as fezes e os parasitas se encontram submetidos (Cruz, 2015; Hernández Malagón, 2014). Para tal, foram criados dois grupos de caixas: caixas de plástico contendo fezes e suspensão fúngica (1 ml para 5 g de fezes) e caixas contendo apenas fezes (controle). Estas caixas foram colocadas no exterior, numa zona com vegetação (Figura 14), sujeitas a variações de temperatura, humidade e luminosidade durante um determinado período de tempo. Apenas se teve o cuidado de pulverizar com água regularmente de forma a evitar a dessecação natural das fezes.

Posteriormente, cada amostra foi analisada em laboratório com o recurso a técnicas coprológicas para, através de comparação com o grupo controlo, se perceber se existia diminuição da carga parasitária no grupo com fungos.

**Figura 14** - Zona com vegetação onde foram colocadas as caixas para realização dos ensaios (original)



#### 4.1. Ensaio em Caixas com Fezes de Primatas Infetados com *Trichuris trichiura*

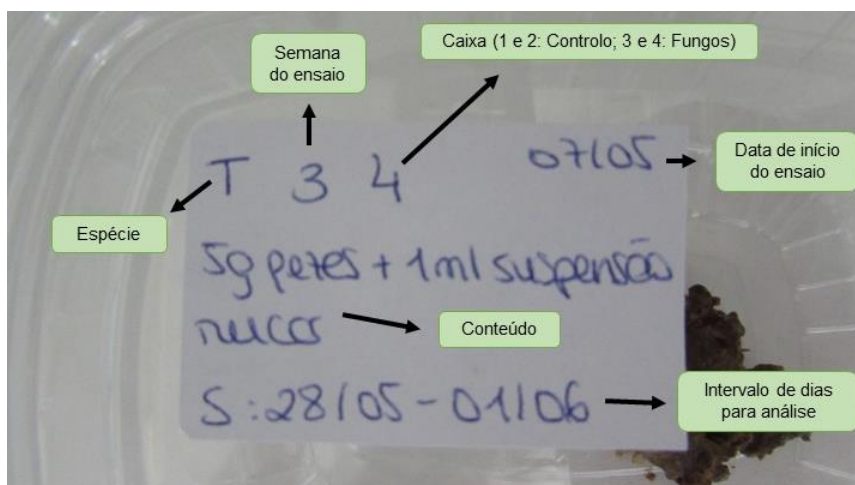
Este ensaio teve como objetivo verificar a eficácia do fungo ovicida *Mucor circinelloides* em ovos de *Trichuris trichiura* encontrados em fezes de macaco-de-tarrafe. Para tal definiu-se uma duração total de 4 semanas, sendo que a atividade do fungo seria avaliada a cada semana. O ensaio decorreu durante o mês de maio de 2018, tendo sido preparadas 4 caixas (2 com suspensão fúngica e 2 controlo) para cada semana, ou seja, um total de 16 caixas para o total do ensaio (Figuras 15 e 16).

Inicialmente foram colhidas quatro amostras de fezes de grupo em dias consecutivos e analisadas com técnicas coprológicas quantitativas. Selecionou-se a que apresentava a contagem de ovos mais elevada e distribuiu-se 5 g por cada caixa. Às caixas do grupo com fungos, adicionou-se 1 ml de suspensão fúngica com concentração de  $1,5 \times 10^6$  esporos/ml e às caixas do grupo controlo apenas 1 ml de água destilada (Cruz, 2015).

**Figura 15** - Conjunto das 16 caixas contendo fezes de macaco-de-tarrafe (original)



**Figura 16** - Pormenor da etiqueta de uma das caixas (original)



As caixas foram então colocadas todas no exterior e ao fim de cada semana eram retiradas 4 (2 com suspensão fúngica e 2 controlo) para se obter o número de OPG através das técnicas coprológicas quantitativas McMaster e Mini-FLOTAC. Assim, para cada semana, foi possível avaliar:

- Taxa de Redução: valor percentual que avalia a variação entre as contagens de OPG do grupo controlo e do grupo com fungos, calculada através da seguinte fórmula (Madeira de Carvalho, 2001):

$$\text{Taxa de Redução (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Média OPG Grupos Fungos}}{\text{Média OPG Grupos Controlo}} \right] \times 100$$

- Taxa de Inviabilidade: avalia a percentagem de ovos inviáveis em cada grupo e calcula-se através da seguinte fórmula (Madeira de Carvalho, 2001):

$$\text{Taxa de Inviabilidade (\%)} = \frac{\text{Nº de ovos inviáveis}}{\text{Nº total de ovos encontrados}} \times 100$$

Para determinar se um ovo está inviável, é necessário avaliar a integridade da cápsula (se está deformada ou com roturas), a existência de aderências e a uniformidade do embrião no interior do ovo (se está alterado, destruído ou inexistente) (Hernández Malagón, 2014).

#### **4.2. Ensaio em Caixas com Fezes de Ungulados Selvagens Infetados com *Parascaris equorum* e Estrongilídeos Gastrointestinais**

Este ensaio decorreu em maio de 2018, paralelamente ao primeiro, sendo bastante semelhante a este, mas com algumas alterações. Para além de verificar a eficácia do fungo *Mucor circinelloides* sobre os ovos de *Parascaris equorum* e de estrongilídeos gastrointestinais, teve também como objetivo avaliar a eficácia do fungo *Duddingtonia flagrans* sobre as L3 destes últimos em fezes de zebra e lama.

Alguns dias antes do ensaio foram recolhidas várias amostras de fezes de grupo e selecionada a que apresentava maior contagem de OPG. Por cada espécie, usaram-se no total 16 caixas para as 4 semanas do ensaio. Para as primeiras 3 semanas, o ensaio decorreu de forma semelhante ao descrito anteriormente. Foram usadas 4 caixas por semana: 2 do grupo fungos, onde se colocaram 10g de fezes juntamente com 2 ml de suspensão fúngica contendo *M. circinelloides* a uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  esporos/ml e 2 do grupo controlo, com 10g de fezes e 2 ml de água destilada. A cada semana realizaram-se as contagens de OPG, recorrendo ao uso das técnicas de McMaster e do Mini-FLOTAC, e foram calculadas as taxas de redução e de inviabilidade (Cruz, 2015; Madeira de Carvalho, 2001).

Na quarta semana do ensaio, para além da contagem de ovos queríamos também quantificar e identificar as L3 que, entretanto, se teriam desenvolvido, bem como verificar a eficácia do

fungo *D. flagrans* sobre as mesmas. Assim foram utilizadas 2 caixas controlo, com 15 g de fezes e 6 ml de água destilada e 2 caixas fungos com 15 g de fezes, 3 ml de suspensão fúngica contendo *M. circinelloides* numa concentração de  $1,5 \times 10^6$  esporos/ml e 3 ml de suspensão fúngica contendo *D. flagrans* numa concentração de 10000 esporos/ml (Cruz, 2015). Para além do McMaster e Mini-FLOTAC, foi ainda realizada a técnica de Baermann que permitiu a identificação das L3 e a obtenção do número de larvas por grama de fezes (LPG). Assim, nesta última semana do ensaio foram também calculadas:

- Taxa de Desenvolvimento Larvar: valor que expressa a percentagem de ovos que se desenvolveram até L3 (Madeira de Carvalho et al., 2007).

$$\text{Taxa de Desenvolvimento Larvar (\%)} = \frac{\text{Média LPG de cada grupo}}{\text{Média OPG amostra inicial utilizada}} \times 100$$

- Taxa de Redução: comparação dos valores de LPG médios entre os grupos controlo e os grupos contendo suspensão fúngica (Madeira de Carvalho et al., 2007).

$$\text{Taxa de Redução (\%)} = \left[ 1 - \frac{\text{Média LPG Grupos Fungos}}{\text{Média LPG Grupos Controlo}} \right] \times 100$$

## 5. Análise Estatística

Os dados de estatística descritiva foram recolhidos e trabalhados no programa “Microsoft Excel 2013”.

A análise dos dados foi realizada através do programa “The R Foundation for Statistical Computing version 3.5.1”.

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição dos dados. As diferenças entre os grupos Fungos e Controlo foram avaliadas através do teste “Welch Two Sample T-Test”, para dados que apresentavam distribuição normal, e “Wilcoxon Rank Sum Test”, quando não existia uma distribuição normal dos dados. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas para valores de  $p < 0,05$  e biologicamente significativas para valores de  $p < 0,1$ , em especial para os estudos em caixas da ação dos fungos nematófagos e de acordo com Madeira de Carvalho et al. (2007).

O coeficiente de correlação de Pearson e o teste de Bland Altman foram utilizados para avaliar a correlação e definir o grau de concordância, respetivamente, entre as técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC. Para avaliar as diferenças entre os dois métodos e os limites de concordância entre os mesmos foi desenhado um gráfico de Bland Altman, onde o eixo do Y corresponde à diferença entre os resultados obtidos pelos dois métodos (McMaster - Mini-FLOTAC) e o eixo do X à média dos resultados obtidos por cada um destes  $((\text{McMaster} + \text{Mini-FLOTAC})/2)$ . A linha central consiste na média das diferenças e as duas linhas exteriores estabelecem os limites de concordância (Giavarina, 2015).



## VI. RESULTADOS

### 1. Nematodes Presentes nas Espécies de Mamíferos do “Monte Selvagem – Reserva Animal”

Através das técnicas coprológicas quantitativas de McMaster e do Mini-FLOTAC foi possível detetar, identificar e quantificar os nematodes presentes nas espécies de mamíferos do Parque Zoológico em estudo. Durante o mês de dezembro foram colhidas amostras populacionais de fezes de cada uma das espécies, que seriam analisadas pelas técnicas acima referidas. Os parasitas detetados encontram-se descritos na Tabela 5.

**Tabela 5** - Parasitas identificados nas espécies de mamíferos do "Monte Selvagem - Reserva Animal" durante o mês de Dezembro

Espécies de Mamíferos	Parasitas Encontrados
Macaco-de-Tarrafe ( <i>Chlorocebus aethiops</i> )	<i>Trichuris</i> spp. <sup>b,c</sup>
Macaco Cauda de Leão ( <i>Macaca silenus</i> )	<i>Trichuris</i> spp. <sup>c</sup>
Macaco Rabo de Porco ( <i>Macaca nemestrina</i> )	<i>Trichuris</i> spp. <sup>a,c</sup>
Macaco-do-Japão ( <i>Macaca fuscata</i> )	-
Saguis-de-Tufo-Branco ( <i>Callithrix jacchus</i> )	-
Lémure-de-Cauda-Anelada ( <i>Lemur catta</i> )	-
Zebra ( <i>Equus burchellii</i> )	EGI <sup>b</sup> , <i>Parascaris</i> spp. <sup>b,c</sup>
Burro ( <i>Equus asinus</i> )	-
Lama ( <i>Lama glama</i> )	EGI <sup>a, b, c</sup>
Iaque ( <i>Bos grunniens</i> )	-
Elande ( <i>Taurotragus oryx</i> )	EGI <sup>b, c</sup> ; <i>Eimeria</i> spp. <sup>b</sup>
Cervicapra ( <i>Antilope cervicapra</i> )	EGI <sup>a,b</sup>
Cobus ( <i>Kobus leche</i> )	EGI <sup>b</sup>
Watussi ( <i>Bos taurus</i> )	-
Cabra Anã ( <i>Capra hircus</i> )	<i>Eimeria</i> spp. <sup>a, b, c</sup>
Ovelha ( <i>Ovis</i> spp.)	<i>Eimeria</i> spp. <sup>b, c</sup>
Gamo ( <i>Dama dama</i> )	EGI <sup>b, c</sup>
Chital ( <i>Axis axis</i> )	-
Veado do Padre David ( <i>Elaphurus davidianus</i> )	-
Rena ( <i>Rangifer tarandus</i> )	-
Javali ( <i>Sus scrofa</i> )	-
Porco do Vietname ( <i>Sus bucculentus</i> )	-
Pecari de Colar ( <i>Pecari tajacu</i> )	-
Canguru de Bennet ( <i>Macropus rufogriseus</i> )	-
Guaxini ( <i>Procyon lotor</i> )	-
Coati ( <i>Nasua nasua</i> )	-
Suricata ( <i>Suricata suricatta</i> )	EGI <sup>c</sup>
Porco-Espinho ( <i>Hystrix africaeaustralis</i> )	<i>Trichuris</i> spp. <sup>a, b, c</sup>
Lebre da Patagônia ( <i>Dolichotis patagonum</i> )	EGI <sup>a, b, c</sup>
Porquinho da Índia ( <i>Cavia porcellus</i> )	EGI <sup>a, b, c</sup>

**Legenda:** a. detetado por McMaster; b. detetado por Mini-FLOTAC (solução saturada NaCl); c. detetado por Mini-FLOTAC (solução saturada ZnSO<sub>4</sub>)

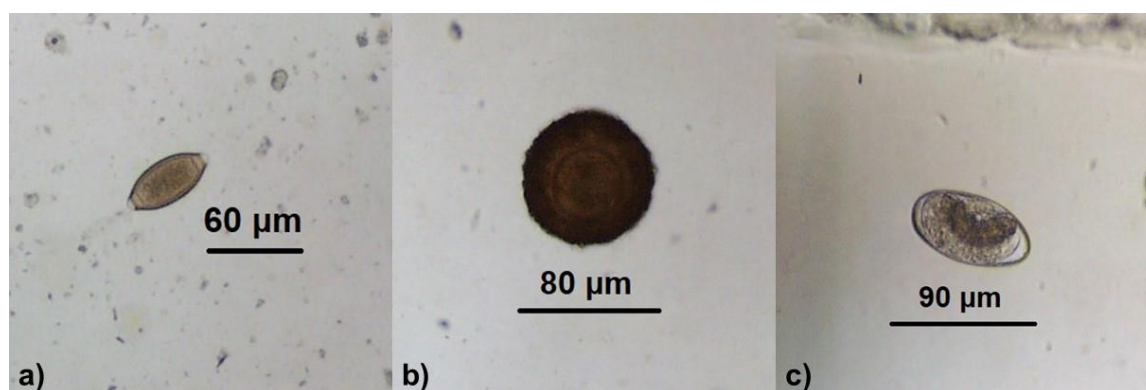


Das 30 espécies de mamíferos presentes no parque, 16 foram diagnosticadas com parasitas gastrointestinais, o que corresponde a uma prevalência de 53%, e verificou-se a presença de nematodes gastrointestinais em 14 espécies, o que se traduz numa prevalência de 47%. No total, 50% dos representantes das espécies de primatas e 47% dos das espécies de ungulados silvestres encontravam-se parasitados. Os nematodes gastrointestinais mais frequentemente encontrados foram os estrongilídeos gastrointestinais (26,7%), seguindo-se *Trichuris* sp. (13,3%) e *Parascaris* sp. (3,3%) (Figura 17). Para além dos nematodes, foi ainda possível verificar a presença de *Eimeria* spp. em três espécies de ruminantes.

Em primatas, o único parasita encontrado foi *Trichuris* spp. numa prevalência de 50%, afetando apenas espécies do Velho Mundo. Nos ungulados, os estrongilídeos gastrointestinais afetavam cerca de 35% das espécies. Dividindo o grupo dos ungulados em perissodáctilos (2 espécies) e artiodáctilos (15 espécies), obteve-se, em relação à presença de EGI, prevalências de 50% e de 33,3%, respetivamente. Em ungulados ruminantes a prevalência foi de 42%.

As contagens de ovos durante o mês de dezembro, nunca ultrapassaram o valor de 300 OPG.

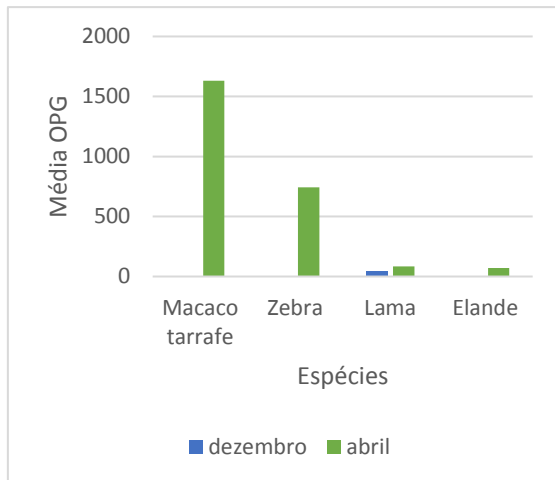
**Figura 17** - Ovos de nematodes gastrointestinais presentes nas fezes de alguns dos mamíferos do "Monte Selvagem - Reserva Animal"



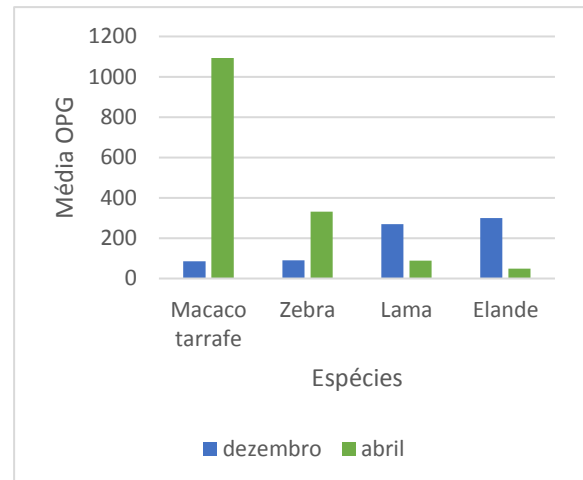
**Legenda:** a) ovo de *Trichuris* sp. em fezes de macaco-de-tarrafe; b) ovo de *Parascaris* sp. em fezes de zebra; c) ovo de estrongilídeo gastrointestinal em fezes de lama.

Durante o mês de abril foram recolhidas novamente amostras de fezes, desta vez apenas das seguintes espécies: macaco-de-tarrafe (*Chlorocebus aethiops*), zebra (*Equus burchellii*), lama (*Lama glama*) e elande (*Taurotragus oryx*). Os parasitas encontrados em cada espécie foram os mesmos que no mês de dezembro, no entanto o número de OPG aumentou na sua maioria. Nos Gráficos 1 e 2 é possível apreciar as diferenças na contagem de ovos entre duas estações do ano distintas, inverno e primavera. É possível verificar, no mês de abril, uma subida acentuada no número de OPG de macacos-de-tarrafe e zebras. Já no caso das lamas e elandes não se verificaram grandes diferenças entre os dois meses, sendo que quando a contagem de ovos foi efetuada através da técnica do Mini-FLOTAC houve uma diminuição do seu número de dezembro para abril.

**Gráfico 1** - Comparação entre os OPG obtidos no mês de dezembro e no mês de abril através da técnica de McMaster



**Gráfico 2** - Comparação entre os OPG obtidos no mês de dezembro e no mês de abril através da técnica do Mini-FLOTAC



Estatisticamente, os dados obtidos através do método de McMaster apresentaram diferenças significativas entre os meses de dezembro e abril (Shapiro-Wilk normality test,  $w = 0.63918$ ,  $p = 0.000454$ , Wilcoxon Rank Sum Test,  $W = 16$ ,  $p = 0.02652$ ). No caso dos valores obtidos pela técnica do Mini-FLOTAC não se verificou essa diferença estatisticamente significativa (Shapiro-Wilk normality test,  $w = 0.69232$ ,  $p = 0.001844$ , Wilcoxon Rank Sum Test,  $W = 9$ ,  $p = 0.8857$ ).

## 2. Ensaio em Caixas com Fungos Nematófagos

### 2.1. Ensaio em Caixas com Fungos Nematófagos e Fezes de Mamíferos Selvagens Infetados com Nematodes Gastrointestinais

#### 2.1.1. Ação do Fungo *Mucor circinelloides* sobre Ovos de Nematodes Gastrointestinais

Neste ensaio foi possível avaliar o efeito do fungo *Mucor circinelloides* em ovos de *Trichuris* spp., *Parascaris* spp. e estrongilídeos gastrointestinais (EGI) eliminados nas fezes de três espécies de mamíferos selvagens mantidos em cativeiro. Para cada uma destas espécies, recolheu-se uma amostra populacional inicial que foi, posteriormente, distribuída por diferentes caixas para a realização do ensaio (Tabela 6).

**Tabela 6** - Valores de OPG das amostras iniciais utilizadas no ensaio em caixas com *Mucor circinelloides*

Espécie	Macaco-de-Tarrafe ( <i>Trichuris</i> spp.)	Zebra ( <i>Parascaris</i> spp.)	Lama (EGI)
Valor de OPG da amostra inicial	1075 OPG* 1325 OPG**	510 OPG* 230 OPG**	300 OPG* 50 OPG**

**Notas:** \*valor obtido através da técnica de McMaster; \*\*valor obtido através da técnica do Mini-FLOTAC

A cada semana (durante um total de quatro semanas) foi avaliada a taxa de redução entre o grupo controlo e o grupo fungos.

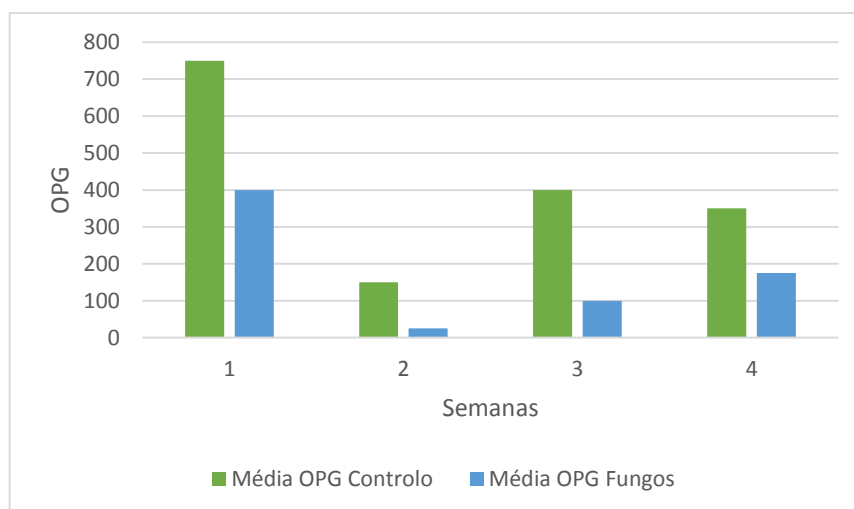
No ensaio utilizando fezes de macaco-de-tarrafe com ovos de *Trichuris* spp. (Tabela 7) verificou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controlo e o grupo Fungos ao longo das quatro semanas de ensaio, tanto para os resultados obtidos através da técnica de McMaster (Shapiro-Wilk normality test,  $w = 0.91355$ ,  $p = 0.1328$ , Welch Two Sample t-test,  $t = 1.8344$ ,  $p = 0.04586$ ), como através da técnica do Mini-FLOTAC (Shapiro-Wilk normality test,  $w = 0.84131$ ,  $p = 0.01018$ , Wilcoxon Rank Sum Test,  $W = 49$ ,  $p = 0.03689$ ). Nos Gráficos 3 e 4 é possível observar as diferenças entre as contagens de OPG do grupo Controlo e do grupo Fungos em cada uma das semanas do ensaio.

As taxas de redução obtidas foram sempre superiores a 45% em todas as semanas, exceto para as contagens obtidas na segunda semana com a técnica do Mini-FLOTAC. As maiores taxas de redução verificaram-se nas semanas 2 e 3 e, em média, a redução global ao fim das 4 semanas de ensaio foi de 63,8% e 51,3%, consoante os valores de OPG foram obtidos através de McMaster ou Mini-FLOTAC, respetivamente.

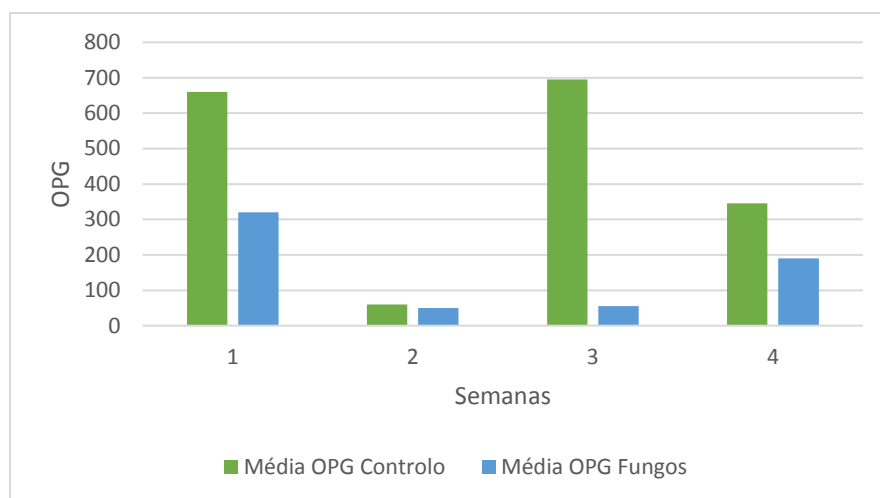
**Tabela 7** - Resultados do ensaio em caixas com o fungo *Mucor circinelloides* e fezes de macaco-de-tarrafe infectados com *Trichuris* spp.

Espécie	Técnica	Semana	Média OPG Controlo	Média OPG Fungos	Taxa de Redução (%)
Macaco-de-Tarrafe	McMaster	1	750	400	47%
		2	150	25	83%
		3	400	100	75%
		4	350	175	50%
	Mini-FLOTAC	1	660	320	51%
		2	60	50	17%
		3	695	55	92%
		4	345	190	45%

**Gráfico 3** - Comparação entre os resultados obtidos entre o grupo Controlo e o grupo Fungos para cada uma das quatro semanas do ensaio em caixas com fezes de macaco-de-tarrafe (técnica de McMaster)



**Gráfico 4** - Comparação entre os resultados obtidos entre o grupo Controlo e o grupo Fungos para cada uma das quatro semanas do ensaio em caixas com fezes de macaco-de-tarrafe (técnica do Mini-FLOTAC)



Para cada caixa foram ainda contabilizados o número de ovos viáveis e inviáveis, de maneira a calcular as Taxas de Viabilidade e Inviabilidade (Tabela 8). Relativamente à percentagem de ovos inviáveis, constataram-se valores superiores nas amostras com fungos em relação às que apenas serviam como grupo Controlo.

**Tabela 8** - Taxas de Viabilidade e Inviabilidade dos grupos Controlo e Fungos no ensaio em caixas com o fungo *Mucor circinelloides* e fezes de macaco-de-tarrafe infetados com *Trichuris* spp.

Técnica	Semana	Média Controlo					Média Fungos				
		Nº ovos contados			% Viabilidade	% Inviabilidade	Nº ovos contados			% Viabilidade	% Inviabilidade
		Viáveis	Inviáveis	Total			Viáveis	Inviáveis	Total		
McMaster	1	15	0	15	100%	0%	8	1	9	89%	11%
	2	3	0	3	100%	0%	0,5	2	2,5	20%	80%
	3	8	0,5	8,5	94%	6%	2	0,5	2,5	80%	20%
	4	7	0,5	7,5	93%	7%	3,5	3	6,5	54%	46%
Mini-FLOTAC	1	66	0	66	100%	0%	31	1	32	97%	3%
	2	6	1	7	86%	14%	5	3	8	62,5%	37,5%
	3	69,5	3,5	73	95%	5%	5,5	1	6,5	85%	15%
	4	34,5	1,5	36	96%	4%	19	20	39	49%	51%

No ensaio utilizando fezes de zebra com ovos de *Parascaris* spp. (Tabela 9), apenas se obteve uma diferença biologicamente significativa entre o grupo Controlo e o grupo Fungos ao longo das quatro semanas e apenas para os valores de OPG obtidos através da técnica do Mini-FLOTAC (Shapiro-Wilk normality test,  $w = 0.89221$ ,  $p = 0.06038$ , Welch Two Sample t-test,  $t = 1.5031$ ,  $p = 0.07814$ ).

Neste ensaio as taxas de redução já foram menos consistentes, existindo inclusive uma semana (Semana 3) que apresentou uma taxa de redução negativa, quando utilizado como método de contagem o Mini-FLOTAC.

**Tabela 9** - Resultados do ensaio em caixas com o fungo *Mucor circinelloides* e fezes de zebra infetadas com *Parascaris* spp.

Espécie	Técnica	Semana	Média OPG Controlo	Média OPG Fungos	Taxa de Redução (%)
Zebra	McMaster	1	450	125	72%
		2	25	0	100%
		3	75	25	67%
		4	425	325	24%
	Mini-FLOTAC	1	117,5	105	11%
		2	62,5	12,5	80%
		3	20	42,5	-113%
		4	105	75	29%

Também neste caso, as Taxas de Inviabilidade de ovos no grupo Fungos foram superiores às encontradas no grupo Controlo (Tabela 10).

**Tabela 10** - Taxas de Viabilidade e Inviabilidade dos grupos Controlo e Fungos no ensaio em caixas com o fungo *Mucor circinelloides* e fezes de zebra infetadas com *Parascaris* spp.

Técnica	Semana	Média Caixas Controlo					Média Caixas Fungos				
		Nº ovos contados			% Viabilidade	% Inviabilidade	Nº ovos contados			% Viabilidade	% Inviabilidade
		Viáveis	Inviáveis	Total			Viáveis	Inviáveis	Total		
McMaster	1	9	0	9	100%	0%	2,5	2	4,5	55,5%	44,5%
	2	0,5	0	0,5	100%	0%	0	2	2	0%	100%
	3	1,5	0	1,5	100%	0%	1,5	1	2,5	60%	40%
	4	8,5	0	8,5	100%	0%	6,5	4,5	11	59%	41%
Mini-FLOTAC	1	23,5	2	25,5	92%	8%	21	8	29	72,5%	27,5%
	2	12,5	1	13,5	93%	7%	2,5	2	4,5	56%	44%
	3	4	0	4	100%	0%	8,5	9,5	18	47%	53%
	4	21	0,5	21,5	98%	2%	15	11,5	26,5	57%	43%

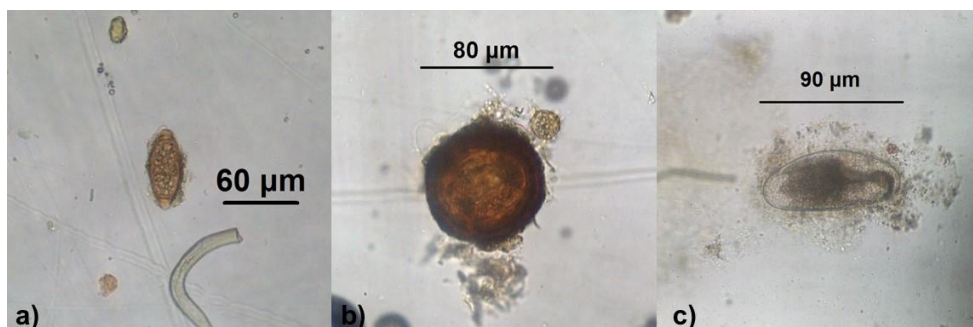
No caso do ensaio em caixas com fezes de lama contendo ovos de estrongilídeos gastrointestinais, a amostra inicial utilizada era de grande tamanho e com uma contagem de ovos bastante baixa. Ao longo das quatro semanas, todas as análises realizadas com McMaster e praticamente todas as realizadas com Mini-FLOTAC se mostraram negativas, tanto no grupo Controlo, como no grupo Fungos (Tabela 11). Por este motivo, os resultados deste ensaio foram considerados inconclusivos e pouco relevantes.

**Tabela 11** - Resultados do ensaio em caixas com o fungo *Mucor circinelloides* e fezes de lama infetadas com EGI

Espécie	Técnica	Semana	Média OPG Controlo	Média OPG Fungos	Taxa de Redução (%)
Lama	McMaster	1	0	0	0%
		2	0	0	0%
		3	0	0	0%
		4	0	0	0%
	Mini-FLOTAC	1	32,5	0	100%
		2	0	0	0%
		3	0	0	0%
		4	0	0	0%

Apesar dos diferentes resultados quantitativos obtidos nas três espécies de mamíferos que participaram no estudo, foi possível observar microscopicamente o efeito do fungo *Mucor circinelloides* nos ovos de nematodes dos diferentes grupos Fungos (Figura 18) e nas diferentes semanas.

**Figura 18** - Ação do fungo *Mucor circinelloides* sobre as diferentes espécies de nematodes do presente estudo



**Legenda:** a) ovo de *Trichuris* spp. inviável com aderências do fungo na cápsula e embrião morfologicamente alterado (Semana 1); b) ovo de *Parascaris* spp. com aderências do fungo e penetração de hifa na cápsula (Semana 2) ; c) ovo de EGI com aderências do fungo, rutura da cápsula e embrião morfologicamente alterado (Semana 3).

### 2.1.2. Ação do Fungo *Duddingtonia flagrans* sobre Larvas de Nematodes Gastrointestinais

Nos ensaios realizados com fezes de zebra e de lama, para além das contagens de ovos, foram também realizadas contagens de larvas nas caixas correspondentes à quarta semana.

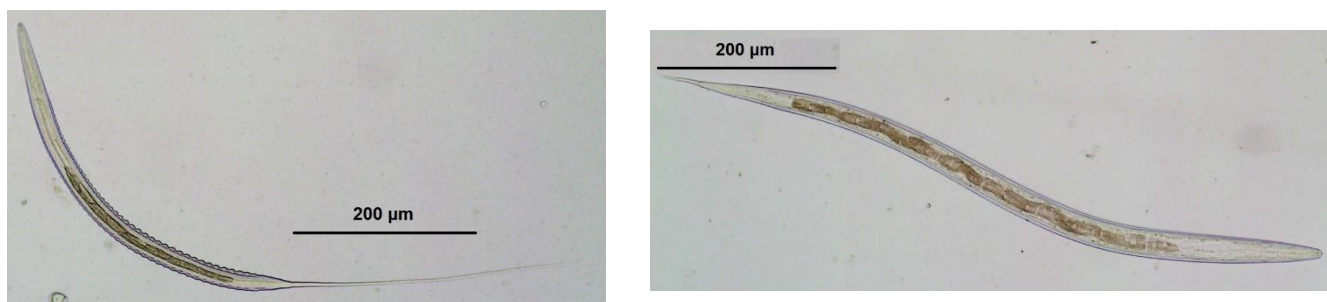
As fezes de zebra mostraram apenas a presença de larvas do género *Cyathostomum*. (Figura 19). Os resultados obtidos encontram-se representados na Tabela 12.

**Tabela 12** - Resultados das contagens de larvas em fezes de zebra

	L3 contadas	LPG	Taxa de Desenvolvimento Larvar (%)	
			McMaster	Mini-FLOTAC
<b>Média Grupo Controlo</b>	3	0,375	0,07%	0,16%
<b>Média Grupo Fungos</b>	18	2,25	0,44%	0,98%
<b>Taxa de Redução (%)</b>	<b>-500%</b>			



**Figura 19** - Larvas de *Cyathostomum* spp. presente em fezes de zebra (1) e de *Trichostrongylus axei* presentes em fezes de lama (2)



Em fezes de lama, o método de Baermann utilizado demonstrou a presença de larvas da espécie *Trichostrongylus axei* (Figura 19) e os resultados das contagens podem ser visualizados na Tabela 13.

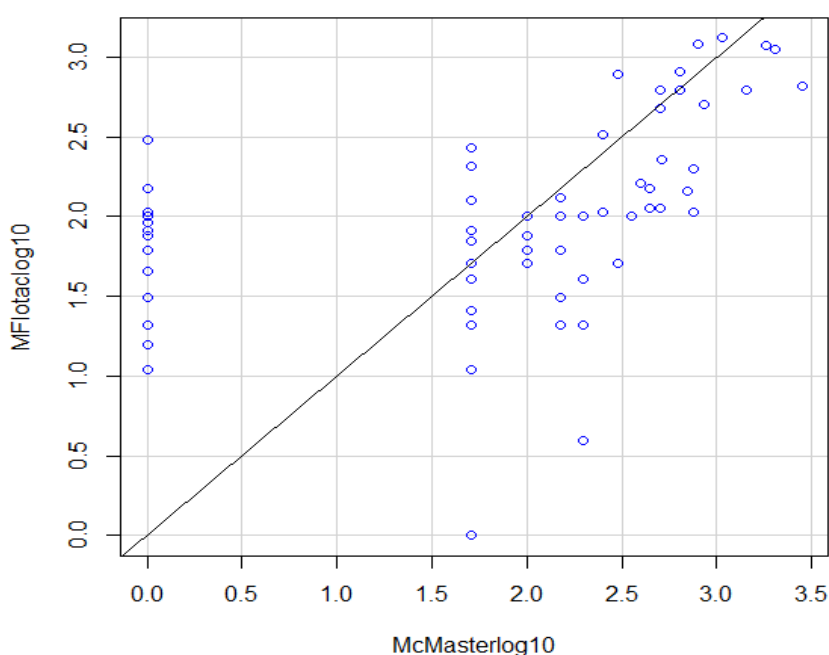
**Tabela 13** - Resultados das contagens de larvas em fezes de lama

	L3 contadas	LPG	Taxa de Desenvolvimento Larvar (%)	
			McMaster	Mini-FLOTAC
<b>Média Grupo Controle</b>	42	5,25	1,75%	10,5%
<b>Média Grupo Fungos</b>	0	0	0%	0%
<b>Taxa de Redução (%)</b>	<b>100%</b>			

### 3. Comparação e Avaliação da Concordância entre Duas Técnicas Coprológicas Quantitativas: McMaster e Mini-FLOTAC

Durante toda a duração do estudo, cada amostra recolhida foi sempre analisada por duas técnicas coprológicas quantitativas distintas, McMaster e Mini-FLOTAC, de modo a comparar os valores de OPG obtidos por cada uma e estabelecer um grau de concordância entre os dois métodos. Os valores obtidos por cada técnica encontram-se descritos no Anexo 3. Estes valores foram transformados em logaritmo de base 10 e representados num gráfico de dispersão (Gráfico 5).

**Gráfico 5** - Gráfico de dispersão dos valores de OPG (transformados em logaritmo de base 10) obtidos através das técnicas de McMaster e do Mini-FLOTAC

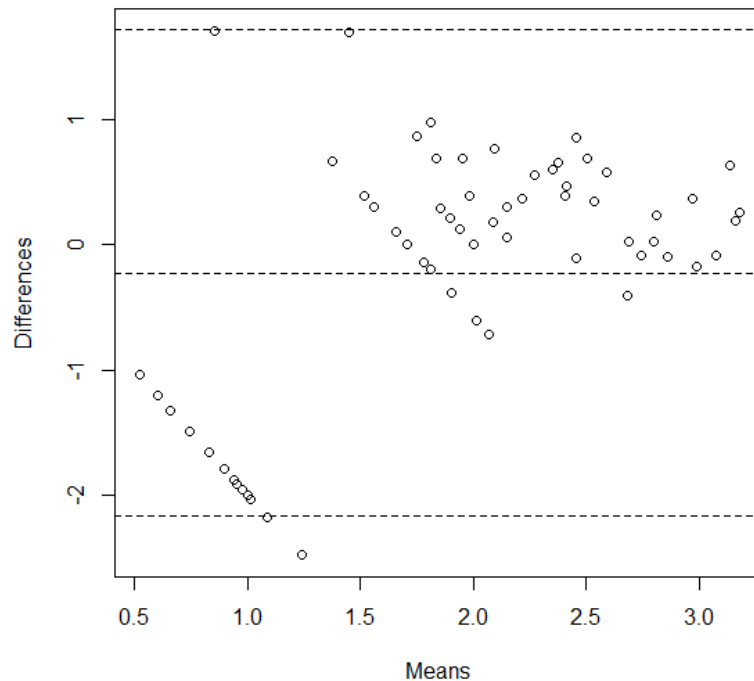


Através da observação do gráfico anterior verifica-se que quanto menor é o número de OPG de uma amostra, maior é a tendência para que os valores obtidos através da técnica de McMaster sejam mais baixos que os do Mini-FLOTAC, muitas vezes com resultados negativos. Pelo contrário, à medida que o número de OPG aumenta, os valores da técnica de McMaster tendem a ultrapassar os valores obtidos através do Mini-FLOTAC.

De modo a avaliar a correlação entre os dois métodos, foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson ( $r=0,73$ ,  $p<0,5$ ). O valor obtido indica-nos a existência de uma boa correlação diretamente proporcional entre os resultados obtidos pelas diferentes técnicas.

Para avaliar as diferenças entre os dois métodos e os limites de concordância entre os mesmos foi desenhado um gráfico de Bland Altman (Gráfico 6). Os valores utilizados foram transformados em logaritmo de base 10 para uma melhor leitura do gráfico.

**Gráfico 6** - Gráfico de Bland Altman para avaliar a concordância entre os resultados obtidos pelas técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC (transformados em valores de logaritmo de base 10)



A comparação entre os resultados de cada método através da análise de Bland Altman demonstrou um baixo nível de concordância entre estes, já que os pontos desenhados no gráfico se encontram maioritariamente afastados da linha central, havendo inclusive pontos que se encontram fora dos limites de concordância estabelecidos.

## VII. DISCUSSÃO

### 1. Nematodes Presentes nas Espécies de Mamíferos do “Monte Selvagem – Reserva Animal”

Os resultados obtidos no rastreio parasitário demonstraram a presença de parasitas que podem afetar o bem-estar dos animais mantidos em cativeiro. A maioria dos parasitas encontrados pertence ao grupo dos nematodes gastrointestinais. Estes resultados vão ao encontro de outros estudos realizados em Parques Zoológicos na Europa, que identificaram os nematodes como o grupo mais frequentemente presente nos animais mantidos em cativeiro (Atanaskova et al., 2011; Gurler et al., 2010; Kvapil et al., 2017; Maesano et al., 2014; Panayotova-Pencheva, 2013).

No caso dos primatas, o único género de parasita encontrado foi *Trichuris*, afetando 3 das 6 espécies do parque. Gurler et al. (2010), também verificaram a presença de parasitas apenas do género *Trichuris* com uma prevalência de 50% nas espécies de primatas do Parque Zoológico Samsun, na Turquia. Outros estudos realizados em primatas mantidos em cativeiro demonstraram, para além de *Trichuris* spp., a presença de outros géneros de nematodes gastrointestinais como *Ascaris*, *Oesophagostomum*, *Enterobius* e *Strongyloides*, no entanto tal não se verificou no presente trabalho (Dawet et al., 2013; Fagiolini et al., 2010; M. Li et al., 2015).

Ao contrário do que aconteceu neste trabalho, um estudo realizado com *Macaca fascicularis* em cativeiro verificou uma baixa prevalência de helmintes (2,03%) e uma elevada prevalência de protozoários (87,40%) (Zanzani, Gazzonis, Epis, & Manfredi, 2016).

As medidas de controlo tomadas, como a limpeza diária das fezes das instalações interiores e a desparasitação dos animais, contribuem para a inexistência de parasitas que habitualmente infetam este grupo de animais (M. Li et al., 2015). Por outro lado, o acesso dos primatas a uma área exterior com vegetação onde as fezes não são recolhidas diariamente, aliado à grande resistência dos ovos às condições ambientais e ao ciclo de vida direto deste parasita, favorece a persistência de *Trichuris* spp. no ambiente, o que pode explicar a sua prevalência nas espécies de animais em causa. A baixa eficácia de alguns antiparasitários frente a este parasita também é um fator a ter em conta nestes casos (Reichard, Wolf, Carey, Garrett, & Briscoe, 2007).

*Trichuris trichiura* é um parasita zoonótico que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, especialmente crianças (Pullan et al., 2014). Os parques zoológicos permitem uma maior proximidade entre humanos e animais selvagens e, portanto, o controlo desta parasitose deve ser da máxima importância para prevenir a infeção tanto de tratadores como de visitantes.

Em relação ao grupo dos ungulados, 47% das espécies analisadas encontravam-se parasitadas. Num rastreio realizado durante 8 anos no Zoo de Ljubljana, os ungulados foram o grupo com maior taxa de parasitismo, na ordem dos 61% (Kvapil et al., 2017). Apesar da realização frequente de desparasitações, a existência de parasitas mantém-se uma realidade, sendo que o tipo de instalação em que a maioria destes animais se encontra pode ser a principal razão para a prevalência reportada (Fagiolini et al., 2010; Goossens, Dorny, Boomker, et al., 2005; Kolapo & Jegede, 2017). Sendo uma instalação de grandes dimensões e em que várias espécies convivem no mesmo espaço a recolha de todas as fezes é praticamente impossível e a transmissão entre diferentes espécies é facilitada. Já os animais deste grupo que se encontravam em instalações de dimensões reduzidas partilhada apenas com indivíduos da mesma espécie e nas quais as fezes são recolhidas diariamente apresentaram resultados negativos no rastreio realizado.

Um estudo realizado em dois Parques Zoológicos italianos (Fagiolini et al., 2010) detetou a presença de helmintes em 50% das espécies de perissodátilos analisadas, uma prevalência igual à obtida no presente trabalho. Em artiodáctilos a prevalência de helmintes (57%) foi, à semelhança deste estudo, superior à de protozoários (25%). Tal como reportado em estudos anteriores, os EGI são bastante frequentes em zebras (Epe et al., 2001; Kuzmina et al., 2013), bem como *Parascaris equorum*, com implicações graves para a sua saúde (Beyazit & Selver, 2011). Um rastreio parasitário em ruminantes utilizando a técnica do FLOTAC detetou a presença de NGI em 48% das amostras analisadas, sendo os EGI o grupo mais frequentemente encontrado (Maesano et al., 2014). Apesar da prevalência de nematodes ser semelhante ao valor apresentado neste trabalho, a prevalência de protozoários, nomeadamente coccídeos, foi muito superior, na ordem dos 41%. O facto de, ao contrário dos EGI, os parasitas do género *Eimeria* serem estenoxenos em relação à espécie de hospedeiro e à localização no próprio hospedeiro diminui a probabilidade de transmissão entre espécies, o que justifica a prevalência mais baixa em relação aos nematodes. Para além disto, um estudo num Parque Nacional da Namíbia com quatro espécies de herbívoros (um monogástrico e três ruminantes) concluiu que a imunidade adquirida é menos protetora em relação às infeções por EGI do que por *Eimeria* spp. (Turner & Getz, 2013).

Os rastreios realizados em duas estações do ano distintas (inverno e primavera) revelaram valores de OPG muito superiores no mês de abril. As temperaturas amenas e a falta de precipitação que se fizeram sentir até dezembro de 2017 em contraste com os períodos de chuva moderada a severa a partir de meados de janeiro de 2018 justificam estes resultados, sendo vários os estudos que indicam a época seca como um fator limitante ao parasitismo (Santos, 2013; Turner & Getz, 2013). No caso generalizado do ciclo de vida dos EGI, a evolução até L3 está dependente da temperatura e humidade sendo que o aumento destas duas variáveis está associado a um desenvolvimento mais rápido dos ovos, com limites inferiores e superiores para ambos os fatores. As larvas de 1º e 2º estágio (L1 e L2) são altamente suscetíveis à dessecação e, apesar das L3 apresentarem uma cutícula protetora, continuam a necessitar de humidade para permitir a sua deslocação sobre a vegetação (O'Connor, Walkden-Brown, & Kahn, 2006).

## **2. Ensaio em Caixas com Fungos Nematófagos e Fezes de Mamíferos Selvagens Infetados com Nematodes Gastrointestinais**

A eficácia do fungo *Mucor circinelloides* na destruição de ovos de nematodes presentes em fezes, tanto de animais domésticos, como selvagens, já foi comprovada (Cortiñas et al., 2015; Cruz, 2015; Hernández Malagón, 2014; Palomero Salinero, 2015).

No ensaio em caixas realizado com fezes de macacos-de-tarrafe demonstrou-se a existência de diferenças significativas entre os dois grupos e obteve-se taxas de redução médias ao longo das 4 semanas de 63,8% e 51,3%, consoante os valores de OPG foram obtidos através das técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC, respetivamente. Para além disto, a percentagem de ovos inviáveis foi sempre superior nas caixas do grupo Fungos em todas as semanas. Estes resultados validam a eficácia da ação do fungo *Mucor circinelloides* contra ovos de *Trichuris* spp presentes em fezes de primatas. Até à data não foi do conhecimento da autora a existência de outros trabalhos científicos que incidam no estudo dos efeitos deste fungo nematófago sobre ovos de *Trichuris trichiuria*. Silva et al. (2011) foram os primeiros a demonstrar a ação ovicida de um fungo nematófago em ovos de *Trichuris trichiuria*. Nesse trabalho foi possível observar a eficácia *in vitro* do fungo *Pochonia chlamydosporia* sobre os ovos isolados de fezes humanas.

No caso do ensaio com fezes de zebra parasitadas com ovos de *Parascaris* spp., também foi possível observar uma redução do número de OPG entre o grupo Controlo e o grupo Fungos, com taxa de redução média de 65,8% nos resultados obtidos pela técnica de McMaster. No entanto, os resultados deste ensaio já foram mais inconstantes, principalmente os obtidos através da técnica do Mini-FLOTAC que apresentou uma taxa de redução negativa na terceira semana do ensaio. Estes resultados podem dever-se à reduzida quantidade de OPG presente inicialmente aliada à grande quantidade da amostra utilizada, que impediu uma boa homogeneização dos ovos na matéria fecal. Um estudo semelhante realizado com fezes de poldros com cerca de 300 OPG de *Parascaris equorum* verificou uma taxa de redução de 68% ao fim de 30 dias da atuação de *Mucor circinelloides* (Hernández Malagón, 2014).

No ensaio com fezes de lama, não foi possível observar o efeito do fungo *Mucor circinelloides* em ovos do tipo estrongilídeo, pois ao longo das quatro semanas as contagens obtidas através das técnicas de McMaster e de Mini-FLOTAC foram quase sempre negativas em ambos os grupos. Num ensaio semelhante em caixas com fezes de gamo, veado e javali parasitados com EGI e *Mucor circinelloides* foram também obtidas contagens muito baixas ou negativas em ambos os grupos (Cruz, 2015). À semelhança do presente trabalho também as amostras iniciais utilizadas eram de grandes dimensões e com valores reduzidos de OPG. Outra justificação possível para os resultados negativos obtidos é o rápido desenvolvimento do ovo do tipo de estrongilídeo até larva L1 (O'Connor et al., 2006), limitando a atuação dos fungos ovicidas.

Nas caixas recolhidas durante a quarta semana, foi possível identificar a presença de larvas do género *Cyathostomum* em fezes de zebra e de *Trichostrongylus axei* em fezes de lama. São vários os estudos que apontam os ciatostomíneos como um dos grupos de parasitas mais frequentes em várias espécies de zebras (Epe et al., 2001; Krecek, Reinecke, Kriek, Horak, & Malan, 1994; Kuzmina et al., 2013). Ao contrário do que se verifica com os nematodes do género *Strongylus*, os ciatostomíneos apresentam um abundante número de espécies com elevada variabilidade genética o que lhes permite sobreviver às desparasitações regulares e desenvolver resistência aos anti-helmínticos utilizados (Kuzmina et al., 2013).

No caso dos lamas, a literatura aponta *Camelostrongylus mentulatus* como o nematode mais prevalente e mais frequentemente detetado (Nissen, Spörndly, Monrad, & Kyvsgaard, 2009; Rickard & Blshop, 1991). *Trichostrongylus axei* também foi assinalado, mas em menor prevalência (Rickard, 1993; Rickard & Blshop, 1991), uma vez que os lamas são hospedeiros alternativos, infetando-se quando partilham a folha de pastagem com outros ruminantes hospedeiros naturais de *T. axei* (Taylor, Coop, & Wall, 2016).

São já vários os estudos que demonstram a eficácia de *Duddingtonia flagrans* na destruição de larvas do tipo estrongilídeo.

No ensaio com fezes de zebra, foi encontrado um maior número de larvas no grupo Controlo do que no grupo Fungos, ao contrário do que seria de esperar. Este resultado pode dever-se ao número baixo de ovos da amostra inicial utilizada e a uma homogeneização deficiente desta antes de ser distribuída pelas diferentes caixas. Zarrin et al. (2017), visualizaram o efeito larvicida *in vitro* de *D. flagrans* sobre larvas da família Strongylidae. Estudos *in vivo* também já demonstraram a eficácia deste fungo quando administrado oralmente através de diferentes fórmulas (Braga, Araújo, et al., 2009; Evangelista, 2018; Hernández, Sánchez-Andrade, et al., 2018). Arias et al. (2013), observaram uma redução na contagem de ovos fecais de estrongilídeos de 100% nos 5 meses pós tratamento anti-helmíntico juntamente com administração oral de *D. flagrans* em zebras mantidas em cativeiro num Parque Zoológico. O tratamento unicamente com anti-helmíntico apresentou uma redução de 100% apenas nos dois primeiros meses. Um outro estudo *in vivo* com zebras em cativeiro demonstrou uma redução de 100% na contagem de ovos de estrongilídeos e um período de reaparecimento de ovos nas fezes de 28 semanas após um controlo parasitário integrado com fármacos anti-helmínticos e esporos de *Duddingtonia flagrans* e *Mucor circinelloides* (Palomero et al., 2018). O uso conjunto de fungos larvicidas e ovicidas permite a obtenção de melhores resultados, ao atuar em diversas fases do ciclo de vida parasitário.

No caso dos lamas, foi obtida uma Taxa de Redução de 100%, sendo que não foi encontrada nenhuma larva no grupo Fungos. Estudos *in vivo* já demonstraram a eficácia da administração oral de *Duddingtonia flagrans* no controlo de nematodes gastrointestinais em ruminantes silvestres mantidos em cativeiro (Cazapal-Monteiro et al., 2014; Miguélez Riádigos et al., 2014). Recentemente, foi realizado um estudo *in vitro* utilizando estrongilídeos gastrointestinais provenientes de um grupo de lamas mantidas em cativeiro num Parque Zoológico no Brasil e duas estirpes de *D. flagrans* (AC001 e CG768). Após 7 dias de interação em placas foi possível observar que os isolados fúngicos eram eficientes na captura e eliminação das L3 e, comparando com um grupo controlo, foram obtidas Taxas de Redução de 87,56% e 90,45% para as estirpes AC001 e CG768, respetivamente (Ramos Rodrigues et al., 2016).



Estudos *in vivo* com animais silvestres mantidos em cativeiro já comprovaram a eficácia conjunta dos fungos *Mucor circinelloides* e *Duddingtonia flagrans* na redução dos estrongilídeos gastrointestinais (Arias, Cazapal-Monteiro, Valderrábano, et al., 2013; Cazapal-Monteiro et al., 2014; Miguélez Riádigos et al., 2014). Neste caso, atua-se tanto contra o ovo, como contra as formas larvares, favorecendo um melhor controlo destes nematodes.

Neste tipo de ensaios, em meio ambiente, há uma variedade de fatores (temperatura, humidade, luminosidade, pH) que influenciam o crescimento tanto dos fungos (Arias, Suárez, Cazapal-Monteiro, Francisco, Lopez-Arellano, et al., 2013; Grønvold et al., 1999; Serna-Jiménez, Quintanilla-Carvajal, Rodríguez, Uribe, & Klotz, 2016), como dos parasitas (Bundy & Cooper, 1989; O'Connor et al., 2006; Reinemeyer, 2009; Turner & Getz, 2013), o que irá sempre condicionar os resultados obtidos. Apesar disto, no ensaio realizado com ovos de *Trichuris* spp., as contagens de ovos foram sempre inferiores no grupo Fungos e em todos os ensaios verificou-se uma maior Taxa de Inviabilidade neste grupo também.

### **3. Comparação e Avaliação da Concordância entre Duas Técnicas Coprológicas Quantitativas: McMaster e Mini-FLOTAC**

As doenças parasitárias são bastante comuns em animais selvagens mantidos em cativeiro e, portanto, o diagnóstico das mesmas é bastante importante para a gestão de Parques Zoológicos. Os resultados obtidos irão influenciar se existe a necessidade de tratamento ou não e quais os anti-helmínticos a utilizar, pelo que o método escolhido deve ser da maior fiabilidade e apresentar valores que se aproximem o mais possível da realidade.

Atualmente a técnica mais utilizada em todo o mundo é a de McMaster, mas já são vários os estudos que apontam o mais recente Mini-FLOTAC como um método com uma maior exatidão e precisão na deteção de nematodes gastrointestinais. Noel et al. (2017) conduziram um estudo de deteção de ovos de estrongilídeos gastrointestinais de cavalos, no qual os resultados indicaram uma precisão de 83,2% e 53,7% e uma exatidão de 42,6% e 23,5% para o Mini-FLOTAC e o McMaster, respetivamente. Outro estudo realizado em bovinos e cavalos verificou que para análises repetidas de uma mesma amostra, o Mini-FLOTAC apresentava resultados com um desvio padrão menor que a técnica de McMaster (Dias de Castro et al., 2017).

No presente estudo, para cada amostra de fezes utilizada foi realizada uma análise com cada uma das técnicas anteriormente referidas, utilizando sempre solução saturada de sódio (NaCl s.g. 1200). Os dados obtidos foram posteriormente analisados através de um gráfico de dispersão de pontos, o que permitiu, numa fase inicial, estabelecer a seguinte apreciação: quanto menor é o número de OPG de uma amostra, maior é a tendência para que os valores obtidos através da técnica de McMaster sejam mais baixos que os do Mini-FLOTAC, enquanto que quando os valores de OPG são mais elevados verifica-se o contrário. Uma vez que o limite de deteção do método de McMaster é de 50 OPG e que este não possui um sistema de homogeneização/filtração tão sofisticado como o Mini-FLOTAC, é fácil de compreender os resultados negativos obtidos quando o valor de OPG da amostra é baixo ( $< 300$  OPG). Por outro lado, o fator de multiplicação do método McMaster (x50) quando comparado com o do Mini-FLOTAC (x5, x10 ou x15) explica que em amostras com valores de OPG mais elevados, os resultados obtidos através da primeira técnica possam estar sobrevalorizados.

Sempre que há a necessidade de trocar um método quantitativo por outro ou avaliar um novo método alternativo, precisamos de ferramentas que nos permitam medir as diferenças existentes, bem como a causa dessas diferenças. Quando se comparam duas técnicas que medem o mesmo, nenhuma delas fornece um resultado absolutamente correto e inequívoco, pelo que se deve tentar avaliar o grau de concordância entre as mesmas. O coeficiente de correlação é utilizado em diversos estudos como um indicador de concordância, no entanto, este analisa a relação entre uma variável e outra e não as diferenças entre as mesmas, pelo que não deve ser utilizado como meio de comparação entre métodos (Giavarina, 2015). Em 1983, Altman e Bland propuseram uma análise da concordância entre duas técnicas quantitativas através do estudo da média das diferenças e da construção de limites de concordância (Altman & Bland, 1983; Martin Bland & Altman, 1986).

Até à data a autora não teve conhecimento de outros estudos que avaliem o grau de concordância entre as técnicas quantitativas de McMaster e Mini-FLOTAC. Os dados obtidos no presente trabalho apresentaram uma forte correlação ( $r=0,73$ ,  $p<0,5$ ), o que nos poderia levar a concluir erradamente que as duas técnicas são concordantes uma com a outra. No entanto, a análise do gráfico de Bland Altman indica-nos a existência de uma fraca concordância entre os dois métodos, sendo que existe uma maior diferença entre os valores quando o OPG da amostra é mais baixo. Isto vai ao encontro das conclusões retiradas através da observação do gráfico de dispersão de pontos mencionado acima.

## VIII. CONCLUSÃO

Este estudo permitiu uma melhor compreensão acerca dos parasitas infetantes de mamíferos selvagens mantidos em cativeiro, o seu diagnóstico e as abordagens ao seu controlo. Os objetivos propostos no início do trabalho foram maioritariamente atingidos.

Através da realização de dois rastreios parasitários foi possível verificar que os mamíferos do parque “Monte Selvagem – Reserva Animal” têm um risco elevado de infeção por nematodes gastrointestinais, especialmente nos meses de Primavera. Os ungulados silvestres apresentam-se maioritariamente parasitados por strongilídeos gastrointestinais e os primatas por *Trichuris trichiura*, sendo este último um parasita zoonótico.

O ensaio em caixas permitiu comprovar a eficácia do fungo *Mucor circinelloides* sobre os ovos de *T. trichiura* em fezes de macaco tarrafe. Durante as 4 semanas do ensaio foi possível verificar a diminuição de ovos no grupo Fungos comparativamente com o grupo Controlo, bem como observar a ação física do fungo sobre a cápsula e embrião dos ovos. Atualmente não existem outros estudos que demonstrem a eficácia de *M. circinelloides* sobre ovos de *T. trichiura*. Embora as taxas de redução do ensaio com ovos de *Parascaris* sp. não tenham sido tão significativas quanto as com ovos de *Trichuris* sp. também foi possível verificar o efeito de *M. circinelloides* sobre os primeiros. Assim, o fungo *M. circinelloides* atua de forma antagonista sobre os ovos de *Trichuris* spp. e *Parascaris* spp., pelo que deve ser considerado um candidato idóneo para o controlo biológico destes nematodes. Relativamente ao ensaio com fezes de lama, apesar dos resultados inconclusivos foi possível observar a ação física sobre um ovo de EGI pelo que (e tendo em conta outros estudos realizados) não se pode descartar a existência eficácia de *M. circinelloides* sobre ovos de EGI em ruminantes selvagens.

A comparação entre resultados obtidos através de duas técnicas coprológicas quantitativas distinta permitiu observar uma forte correlação entre as mesmas. No entanto, através da análise de Bland Altman estabeleceu-se que existem diferenças e uma baixa concordância entre o McMaster e o Mini-FLOTAC, pelo que deve haver alguma precaução ao fazer comparações diretas entre estudos que utilizem contagens de ovos obtidas pelas diferentes técnicas.

## IX. PERSPETIVAS FUTURAS

A presença de nematodes gastrointestinais nos mamíferos selvagens mantidos em cativeiro é algo que afeta a saúde dos animais e influencia a gestão veterinária dos Parques Zoológicos. Nesse sentido, estudos sobre as espécies parasitárias mais prevalentes e os melhores métodos de diagnóstico e prevenção/tratamento são cada vez mais importantes e a atualização destes temas deve ser constante.

O Mini-FLOTAC, devido à sua grande sensibilidade que lhe permite obter resultados mais fiáveis aliada à sua fácil utilização tornam-no um dos métodos de eleição no diagnóstico de parasitas em campo. No presente estudo, não foi possível estabelecer uma concordância elevada entre este e o atualmente mais utilizado método de diagnóstico parasitário, McMaster. Sendo este, dentro do conhecimento da autora, o primeiro trabalho a usar o teste de Bland Altman para avaliar as diferenças entre os dois métodos, sugerem-se mais estudos utilizando uma maior amostragem de modo a confirmar os resultados obtidos.

O Controlo Biológico surge como um método complementar ao tratamento anti-helmíntico, atuando não só no tratamento, mas também na prevenção da infeção por nematodes e diminuindo as resistências provocadas pelos fármacos comumente utilizados. O presente trabalho obteve resultados bastante promissores no que toca ao controlo de nematodes por *Mucor circinelloides*, principalmente no caso do género *Trichuris* que infeta os primatas mantidos em cativeiro e é um potencial agente zoonótico. Até à data não foi do conhecimento da autora a existência de outros trabalhos científicos que incidam no estudo dos efeitos deste fungo nematófago sobre ovos de *Trichuria trichiuris*, pelo que seria interessante continuar esta linha de investigação com posteriores estudos *in vivo*, com passagem do fungo pelo trato gastrointestinal dos primatas. Recentemente, na Austrália, já foi registrado o primeiro produto veterinário antiparasitário com um fungo nematófago na sua composição (APVMA, 2018). Esperemos que no futuro, com a continuação da evolução do conhecimento acerca desta matéria, este tipo de produto possa vir a ser tão comum como os fármacos anti-helmínticos tradicionais, sendo a sua utilização frequente no controlo dos nematodes gastrointestinais nos Parques Zoológicos de todo o mundo.

## X. BIBLIOGRAFIA

- Adetunji, V. (2014). Prevalence of gastro-intestinal parasites in primates and their keepers from two zoological gardens in Ibadan, Nigeria. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, 12(2), 25–30. <https://doi.org/10.4314/sokjvs.v12i2>.
- Altman, D. G., & Bland, J. M. (1983). Measurement in Medicine: The Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician*, 32(3), 307. <https://doi.org/10.2307/2987937>
- Alvarado-Villalobos, M. A., Cringoli, G., Maurelli, M. P., Cambou, A., Rinaldi, L., Barbachano-Guerrero, A., ... Serio-Silva, J. C. (2017). Flotation techniques (FLOTAC and mini-FLOTAC) for detecting gastrointestinal parasites in howler monkeys. *Parasites and Vectors*, 10(1), 586. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2532-7>
- Araújo, J. V., Sampaio, W. M., Vasconcellos, R. S., & Campos, A. K. (2000). Effects of different temperatures and mineral salt on pellets of *Monacrosporium thaumasium* - a nematode-trapping fungus. *Veterinarski Arhiv*, 70(4), 181–190.
- Arias, M. S., Cazapal-Monteiro, C. F., Suárez, J., Miguélez, S., Francisco, I., Arroyo, F. L., ... Mendoza De Gives, P. (2013). Mixed production of filamentous fungal spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: A preliminary analysis. *BioMed Research International*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/567876>
- Arias, M. S., Cazapal-Monteiro, C., Valderrábano, E., Miguélez, S., Rois, J. L., López-Arellano, M. E., ... Paz-Silva, A. (2013). A preliminary study of the biological control of strongyles affecting equids in a zoological park. *Journal of Equine Veterinary Science*, 33(12), 1115–1120. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2013.04.013>
- Arias, M. S., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C. F., Francisco, I., Lopez-Arellano, M. E., Piñeiro, P., ... Paz-silva, A. (2013). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal Biology*, 117(7–8), 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.06.003>
- Arias, M. S., Suárez, J., Cazapal-Monteiro, C. F., Francisco, I., López-Arellano, M. E., Piñeiro, P., ... Paz-Silva, A. (2013). Trematodes enhance the development of the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys (Duddingtonia) flagrans*. *Fungal Biology*, 117(7–8), 540–544. <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2013.06.003>
- Arizono, N., Yamada, M., Tegoshi, T., & Onishi, K. (2012). Molecular identification of oesophagostomum and trichuris eggs isolated from wild Japanese macaques. *Korean Journal of Parasitology*, 50(3), 253–257. <https://doi.org/10.3347/kjp.2012.50.3.253>
- Arroyo Balán, F. L. (2017). *Formulación de esporas de hongos parasiticidas en pellets*

- nutricionales*. Tese de Doutorado. Lugo: Faculdade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela.
- Arroyo Balán, F. L., Arias, M. S., Cazapal-Monteiro, C. F., Hernández, J. A., Suárez, J., Miguélez, S., ... Paz-Silva, A. (2016). The capability of the fungus *Mucor circinelloides* to maintain parasitocidal activity after the industrial feed pelleting enhances the possibilities of biological control of livestock parasites. *Biological Control*, 92, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.09.007>
- Ashford, R. W., Reid, G. D. F., & Wrangham, R. W. (2000). Intestinal parasites of the chimpanzee *Pan troglodytes* in Kibale Forest, Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 94(2), 173–179.
- Assis, R. C. L., Luns, F. D., Araújo, J. V., & Braga, F. R. (2012). Biological control of trichostrongyles in beef cattle by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Experimental Parasitology*, 132(3), 373–377. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.013>
- Atanaskova, E., Kochevski, Z., & Nikolovski, G. (2011). Endoparasites in wild animals at the zoological garden in Skopje, Macedonia. *Journal of Threatened Taxa*, 3(July), 1955–1958. <https://doi.org/10.11609/JoTT.o2440.1955-8>
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority [APVMA]. (2018). Public Release Summary on the evaluation of the new active *Duddingtonia* Diagrans in the products BioWorma® and Livamol with BioWorma®. Retirado de [www.dpmc.gov.au/pmc/publication/commonwealth-coat-arms-information-and-guidelines](http://www.dpmc.gov.au/pmc/publication/commonwealth-coat-arms-information-and-guidelines)
- Bañolas, M., Janio, J. I., Santurio, M., & Luiz De La Rue, M. (2008). *Duddingtonia flagrans*: controle biológico de nematodeos de bovinos a campo. *Ciência Rural*, 38(8), 2256–2263. <https://doi.org/10.1590/S0103-84782008000800026>
- Barda, B., Cajal, P., Villagran, E., Cimino, R., Juarez, M., Krolewiecki, A., ... Albonico, M. (2014). Mini-FLOTAC, Kato-Katz and McMaster: Three methods, one goal; Highlights from north Argentina. *Parasites and Vectors*, 7(1), 271. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-271>
- Bartosik, J., & Górski, P. (2010). The intestinal parasites of the selected mammal species, living in zoological gardens and wild animal parks. *Roczniki Naukowe Polskiego Towarzystwa Zootechnicznego*, 6(3), 143–150.
- Beyazıt, A., & Selver, M. M. (2011). Parasites observed in a zebra in Izmir. *Turkiye Parazit Derg*, 35, 204–210. <https://doi.org/10.5152/tpd.2011.51>

- Bordbring-Hertz, B., Jansson, H. B., & Tunlid, A. (2006). Nematophagous Fungi. In *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1–11).
- Bowman, D. D. (2014). *Georgi's Parasitology for Veterinarians*. (D. D. Bowman, Ed.) (10th ed.). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Braga, F. R., & Araújo, J. V. (2014). Nematophagous fungi for biological control of gastrointestinal nematodes in domestic animals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(1), 71–82. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5366-z>
- Braga, F. R., Araújo, J. V., Silva, A. R., Araujo, J. M., Carvalho, R. O., Tavela, A. O., ... Carvalho, G. R. (2009). Biological control of horse cyathostomin (Nematoda: Cyathostominae) using the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* in tropical southeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 163(4), 335–340. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.05.003>
- Braga, F. R., Carvalho, R. O., Araujo, J. M., Silva, A. R., Araújo, J. V., Lima, W. S., ... Ferreira, S. R. (2009). Predatory activity of the fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium*, *Monacrosporium sinense* and *Arthrobotrys robusta* on *Angiostrongylus vasorum* first-stage larvae. *Journal of Helminthology*, 83(04), 303. <https://doi.org/10.1017/S0022149X09232342>
- Braga, F. R., Soares, F. E. F., Giuberti, T. Z., Carmen Garcias Lopes, A. Del, Lacerda, T., Ayupe, T. de H., ... Araújo, J. V. (2015). Nematocidal activity of extracellular enzymes produced by the nematophagous fungus *Duddingtonia flagrans* on cyathostomin infective larvae. *Veterinary Parasitology*, 212(3–4), 214–218. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.08.018>
- Bravo, P. W. (2015). Camelidae. In R. E. Miller & M. E. Fowler (Eds.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Vol 8, pp. 592–601). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Brooker, S., Clements, A. C. A., & Bundy, D. A. P. (2006). Global Epidemiology, Ecology and Control of Soil-Transmitted Helminth Infections. *Advances in Parasitology*, 62, 221–261. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)62007-6](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)62007-6)
- Bundy, D. A. P., & Cooper, E. S. (1989). Trichuris and Trichuriasis in Humans. *Advances in Parasitology*, 28(C), 107–173. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60332-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60332-2)
- Burke, J. M., & Miller, J. E. (2008). Dietary copper sulfate for control of gastrointestinal nematodes in goats. *Veterinary Parasitology*, 154(3–4), 289–293. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2008.03.010>
- Calle, P. P., & Joslin, J. O. (2015). New World and Old World Monkeys. In R. E. Miller & M. E. Fowler (Eds.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Vol 8, pp. 301–335). St. Louis,

Missouri: Elsevier.

- Cameira, R. (2018). *Gastrointestinal Symbionts of Wild Chimpanzees and Sympatric Colobus Monkeys Living in Close Proximity of Humans in Liberia and Uganda*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- Cazapal-Monteiro, C. (2015). *Posibilidades De Control De Helminto zoonosis En Galicia*. Tese de Doutoramento. Lugo: Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela.
- Cazapal-Monteiro, C., Arias Vázquez, M. S., Al Hernández Malagón, J., Fernández Marcos, M., Valderrábano Cano, E., Rois Losada, J. L., ... Madeira de Carvalho, L. M. (2014). Control Ecológico de Parásitos en Herbívoros Salvajes en Pastoreo. *Pastagens e Forragens*, 34, 22–33.
- Cazapal-Monteiro, C., Hernández, J. A., Arroyo, F. L., Miguélez, S., Romasanta, Á., Paz-Silva, A., ... Arias, M. S. (2015). Analysis of the effect of soil saprophytic fungi on the eggs of *Baylisascaris procyonis*. *Parasitology Research*, 114(7), 2443–2450. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4440-0>
- Chartier, C., & Pors, I. (2003). Effect of the nematophagous fungus, *Duddingtonia flagrans*, on the larval development of goat parasitic nematodes: A plot study. *Veterinary Research*, 34(2), 221–230. <https://doi.org/10.1051/vetres:2002069>
- Clayton, H. (1986). Ascarids: recent advances. In Herd RP (Ed.), *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* (pp. 313–328).
- Coop, R. L., & Kyriazakis, I. (2001). Influence of host nutrition on the development and consequences of nematode parasitism in ruminants. *Trends in Parasitology*, 17(7), 325–330. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(01\)01900-6](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(01)01900-6)
- Corning, S. (2009). Equine cyathostomins: a review of biology, clinical significance and therapy. *Parasites & Vectors*, 2(2). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S2-S1>
- Cortiñas, F. J., Cazapal-Monteiro, C. F., Hernández, J. A., Arroyo, F. L., Miguélez, S., Suárez, J., ... Arias, M. S. (2015). Potential use of *Mucor circinelloides* for the biological control of certain helminths affecting livestock reared in a care farm. *Biocontrol Science and Technology*, 25(12), 1443–1452. <https://doi.org/10.1080/09583157.2015.1062843>
- Craig, T. M., Diamond, P. L., Ferwerda, N. S., & Thompson, J. A. (2007). Evidence of Ivermectin Resistance by *Parascaris equorum* on a Texas Horse Farm. *Journal of Equine Veterinary Science*, 27(2), 67–71. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2006.12.002>



- Cringoli, G., Maurelli, M. P., Levecke, B., Bosco, A., Vercruysse, J., Utzinger, J., & Rinaldi, L. (2017). The Mini-FLOTAC technique for the diagnosis of helminth and protozoan infections in humans and animals. *Nature Protocols*, 12(9), 1723–1732. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.067>
- Cringoli, G., Rinaldi, L., Maurelli, M. P., & Utzinger, J. (2010). FLOTAC: New multivalent techniques for qualitative and quantitative copromicroscopic diagnosis of parasites in animals and humans. *Nature Protocols*, 5(3), 503–515. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.235>
- Cruz e Silva, J. A., Roque, M. M. A., & Mendonca, M. M. (1973). As helmintoses como factor de fundamental importancia sanitária nos animais selvagens em cativeiro. *Rev. Port. Cienc. Vet.*, 68, 260–274.
- Cruz, R. (2015). *Atividade de fungos sobre ovos, larvas e oocistos de parasitas de ungulados silvestres e do cão*. Faculdade de Medicina Veterinária. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- Cunningham, A. A. (1996). Disease Risks of Wildlife Translocations. *Conservation Biology*, 10(2), 349–353. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1996.10020349.x>
- Dărbăuș, G., Afrenie, M., Hotea, I., Imre, M., & Morariu, S. (2014). Endoparasites in Mammals From Seven Zoological Gardens in Romania. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 45(2), 239–246. <https://doi.org/10.1638/2012-0170.1>
- Dawet, A., Yakubu, D., & Butu, H. (2013). Survey of Gastrointestinal Parasites of Non-Human Primates in Jos Zoological Garden. *Journal of Primatology*, 2(1). <https://doi.org/10.4172/2167-6801.1000108>
- Dias de Castro, L. L., Abrahão, C. L. H., Buzatti, A., Molento, M. B., Bastianetto, E., Rodrigues, D. S., ... Borges, F. de A. (2017). Comparison of McMaster and Mini-FLOTAC fecal egg counting techniques in cattle and horses. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 10, 132–135. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.10.003>
- Doležalová, J., Oborník, M., Hajdušková, E., Jirku, M., Petrželková, K. J., Bolechová, P., ... Modrý, D. (2015). How many species of whipworms do we share? Whipworms from man and other primates form two phylogenetic lineages. *Folia Parasitologica*, 62(063). <https://doi.org/10.14411/fp.2015.063>
- Duddington, C. L. (1949). A new predaceous species of *Trichothecium*. *Transactions of the British Mycological Society*, 32(3–4), 284–287. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(49\)80019-2](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(49)80019-2)

- Duddington, C. L. (1955). Fungi that Attack Microscopic Animals. *The Botanical Review*, 21(7), 373–439.
- Duddington, C. L. (1962). Predacious Fungi and Nematodes. *EXPERIENTIA*, 18(12), 537–592.
- Durette-Desset, M. C., Fribourg-Blanc, L. A., & Vuong, P. N. (2001). *Molineus torulosus* (Nematoda, Trichostrongylida, Molineoidea) a parasite of Neotropical primates: new morphological and histological data. *Parasite*, 8(1), 53–60. <https://doi.org/10.1051/parasite/2001081053>
- Epe, C., Kings, M., Stoye, M., & Böer, M. (2001). The prevalence and transmission to exotic equids (*Equus quagga antiquorum*, *Equus przewalskii*, *Equus africanus*) of intestinal nematodes in contaminated pasture in two wild animal parks. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 32(2), 209–216. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2001\)032\[0209:TPATTE\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2001)032[0209:TPATTE]2.0.CO;2)
- Evangelista, F. (2018). *New Administration Formula of Parasiticide Fungi Spores to Prevent Infection by Gastrointestinal Nematodes in Pasturing Horses*. Faculdade de Medicina Veterinária. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- Facchini Rodrigues, J. V., Braga, F. R., Campos, A. K., de Carvalho, L. M., Araujo, J. M., Aguiar, A. R., ... de Araújo, J. V. (2018). *Duddingtonia flagrans* formulated in rice bran in the control of *Oesophagostomum* spp. intestinal parasite of swine. *Experimental Parasitology*, 184, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.11.001>
- Fagiolini, M., Lia, R. P., Laricchiuta, P., Cavicchio, P., Mannella, R., Cafarchia, C., ... Perrucci, S. (2010). Gastrointestinal parasites in mammals of two Italian zoological gardens. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(4), 662–670. <https://doi.org/10.1638/2010-0049.1>
- Fernández, A. S. (1998). *Duddingtonia flagrans* as a biological control agent against parasitic nematodes of cattle and horses. Tese de Doutorado. Dinamarca: The Royal Veterinary and Agricultural University.
- Ferreira, S. R., Araújo, J. V. de, Soares, F. E. de F., Braga, F. R., Tavela, A. de O., Araujo, J. M., & Carvalho, G. R. (2012). Control of *Strongyloides westeri* by nematophagous fungi after passage through the gastrointestinal tract of donkeys. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(2), 157–160. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200016>
- Ferreira, W., Silveira, D., Braga, F. R., De Oliveira Tavela, A., Fernando Dos Santos, L., Reis

- Domingues, R., ... Victor De Araújo, J. (2017). Nematophagous fungi combinations reduce free-living stages of sheep gastrointestinal nematodes in the field. *Journal of Invertebrate Pathology*, 150, 1–5. <https://doi.org/10.1016/J.JIP.2017.08.013>
- Fontenot, D. K., Kinney-Moscona, A., Kaplan, R. M., & Miller, J. (2008). Effects of copper oxide wire particle bolus therapy on trichostrongyle fecal egg counts in exotic artiodactylids. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine : Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 39(4), 642–645. <https://doi.org/10.1638/2007-0069.1>
- Fontenot, D. K., & Miller, R. E. (2012). Alternatives for Gastrointestinal Parasite Control in Exotic Ruminants. In R. E. Miller & M. E. Fowler (Eds.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine: current teraphy* (Vol 7). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Garijo, M. M., Ortiz, J. M., & Ruiz de Ibáñez, M. R. (2004). Helminths in a giraffe (*Giraffa camelopardalis xgiraffa*) from a zoo in Spain. *The Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 71(2), 153–156.
- Garretson, P. D., Hammond, E. E., Craig, T. M., & Holman, P. J. (2009). Anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in a giraffe (*Giraffa camelopardalis*) in Florida. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine : Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 40(1), 131–139. <https://doi.org/10.1638/2007-0094.1>
- Geraghty, V., Mooney, J., & Pike, K. (1981). A study of parasitic infections in mammals and birds at the Dublin Zoological Gardens. *Veterinary Research Communications*, 5(1), 343–348.
- Ghai, R. R., Chapman, C. A., Omeja, P. A., Davies, T. J., & Goldberg, T. L. (2014). Nodule Worm Infection in Humans and Wild Primates in Uganda: Cryptic Species in a Newly Identified Region of Human Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(1), 39. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002641>
- Ghai, R. R., Simons, N. D., Chapman, C. A., Omeja, P. A., Davies, T. J., Ting, N., & Goldberg, T. L. (2014). Hidden Population Structure and Cross-species Transmission of Whipworms (*Trichuris* sp.) in Humans and Non-human Primates in Uganda. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003256>
- Giavarina, D. (2015). Understanding Bland Altman analysis. *Biochemia Medica*, 25(2), 141–151. <https://doi.org/10.11613/BM.2015.015>
- Goodwin, L. G. (1991). Parasites and zoos. *Parasitology Today (Personal Ed.)*, 7(10), 265. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(91\)90090-B](https://doi.org/10.1016/0169-4758(91)90090-B)
- Goossens, E., Dorny, P., Boomker, J., Vercammen, F., & Vercruysse, J. (2005). A 12-month survey of the gastro-intestinal helminths of antelopes, gazelles and giraffids kept at two

- zoos in Belgium. *Veterinary Parasitology*, 127(3–4), 303–312.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.013>
- Goossens, E., Dorny, P., Vercammen, F., & Vercruysse, J. (2005). Field evaluation of the efficacy of fenbendazole in captive wild ruminants. *The Veterinary Record*, 157(19), 582–6. <https://doi.org/10.1136/VR.157.19.582>
- Graham, G. L. (1960). Parasitism in Monkeys. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 85(3), 842–860.
- Grønvold, J., Henriksen, S. A., Larsen, M., Nansen, P., & Wolstrup, J. (1996). Biological control. Aspects of biological control - with special reference to arthropods, protozoans and helminths of domesticated animals. In *Veterinary Parasitology* (Vol. 64, pp. 47–64). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(96\)00967-3](https://doi.org/10.1016/0304-4017(96)00967-3)
- Grønvold, J., Nansen, P., Henriksen, S. A., Larsen, M., Wolstrup, J., Bresciani, J., ... Fribert, L. (1996). Induction of traps by *Ostertagia ostertagi* larvae, chlamydospore production and growth rate in the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans*. *Journal of Helminthology*, 70(04), 291–297. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00015571>
- Grønvold, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Henriksen, S. A., Larsen, M., & Bresciani, J. (1993). Biological control of nematode parasites in cattle with nematode-trapping fungi: a survey of Danish studies. *Veterinary Parasitology*, 48(1–4), 311–325. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90165-J](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90165-J)
- Grønvold, J., Wolstrup, J., Nansen, P., Larsen, M., Henriksen, S. A., Bjørn, H., ... Kristiansen, H. L. (1999). Biotic and abiotic factors influencing growth rate and production of traps by the nematode-trapping fungus *Duddingtonia flagrans* when induced by *Cooperia oncophora* larvae. *Journal of Helminthology*, 73(02), 129–136. <https://doi.org/doi:10.1017/S0022149X99000190>
- Gurler, A. T., Beyhan, Y. E., Acici, M., Bolukbas, C. S., & Umur, S. (2010). Helminths of mammals and birds at the Samsun Zoological Garden, Turkey. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 41(2), 218–223. <https://doi.org/10.1638/2009-0070R1.1>
- Hasegawa, H., Hayashida, S., Ikeda, Y., & Sato, H. (2009). Hyper-variable regions in 18S rDNA of *Strongyloides* spp. as markers for species-specific diagnosis. *Parasitology Research*, 104, 869–874.
- Healy, G. R., & Myers, B. J. (1973). Intestinal helminths. In *The Chimpanzee* (pp. 265–296).
- Hernández Malagón, J. A., Arroyo, F. L., Silva, M. I., & Palomero, A. M. (2018). Biological control of soil transmitted helminths (STHs) in a zoological park by using saprophytic fungi. *Biological Control*, 122(April), 24–30.

- Hernández Malagón, J. A., Sánchez-Andrade, R., Cazapal-Monteiro, C. F., Arroyo, F. L., Sanchís, J. M., Paz-Silva, A., & Arias, M. S. (2018). A combined effort to avoid strongyle infection in horses in an oceanic climate region: Rotational grazing and parasitocidal fungi. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2827-3>
- Hernández Malagón, J. A. (2014). *Posibilidades de control de helmintozoonosis mediante el uso de hongos telúricos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lugo: Facultad de Veterinaria:Universidade de Santiago de Compostela
- Hernández Malagón, J. A., Vázquez-Ruiz, R. A., Cazapal-Monteiro, C. F., Valderrábano, E., Arroyo Balán, F. L., Francisco, I., ... Arias, M. S. (2017). Isolation of Ovicidal Fungi from Fecal Samples of Captive Animals Maintained in a Zoological Park. *Journal of Fungi*, 3(4), 29. <https://doi.org/10.3390/jof3020029>
- Hoberg, E. P., Kocan, A. A., & Rickard, L. G. (2001). Gastrointestinal Strongyles in Wild Ruminants. In W. M. Samuel, M. J. Pybus, & A. A. Kocan (Eds.), *Parasitic Diseases of Wild Mammals* (2nd ed.). Iowa: Iowa State University Press.
- Horii, Y., Imada, I., Yanagida, T., Usui, M., & Mori, A. (1982). Parasite changes and their influence on the body weight of Japanese monkeys (*Macaca fuscata fuscata*) of the Koshima troop. *Primates*, 23(3), 416–431. <https://doi.org/10.1007/BF02381324>
- Hussain, S., Ram, M. S., Kumar, A., Shivaji, S., & Umapathy, G. (2013). Human Presence Increases Parasitic Load in Endangered Lion-Tailed Macaques (*Macaca silenus*) in Its Fragmented Rainforest Habitats in Southern India. *PLoS ONE*, 8(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063685>
- Isaza, R., Courtney, C. H., & Kollias, G. V. (1995). The Prevalence of Benzimidazole-Resistant Trichostrongyloid Nematodes in Antelope Collections in Florida. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 26(2), 260–264.
- Janssen, D. L., & Allen, J. L. (2015). Equidae. In R. E. Miller & M. E. Fowler (Eds.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Vol 8, pp. 559–567). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Kagira, J. M. ., Oluoch, G. ., Waititu, K. ., Mulei, I. ., Maingi, N. ., & Ngotho, M. . (2011). High efficacy of combined albendazole and ivermectin treatment against gastrointestinal nematodes in vervet monkeys and baboons. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science*, 38(3), 187–193.
- Kolapo, T. U., & Jegede, O. H. (2017). A Survey of Gastrointestinal Parasites of Captive Animals at the University of Ilorin Zoological Garden. *Vom Journal of Veterinary Science*, 12(September), 17–27.

- Kooriyama, T., Hasegawa, H., Shimozuru, M., Tsubota, T., Nishida, T., & Iwaki, T. (2012). Parasitology of five primates in Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates*, 53(4), 365–375. <https://doi.org/10.1007/s10329-012-0311-9>
- Kouassi, R. Y., McGraw, S. W., Yao, P. K., Abou-Bacar, A., Brunet, J., Pesson, B., ... Candolfi, E. (2015). Diversity and prevalence of gastrointestinal parasites in seven non-human primates of the Tai National Park, Cote d'Ivoire. *Parasite*, 22, 1. <https://doi.org/10.1051/parasite/2015001>
- Kreis, H. A. (1932). A New Pathogenic Nematode of the Family Oxyuroidea , *Oxyuronema atelophora* n . g . n . sp . in the Red-Spider Monkey , *Ateles geoffroyi*. *The Journal of Parasitology*, 18(4), 295–302.
- Kuzmina, T., & Kharchenko, V. (2008). Anthelmintic resistance in cyathostomins of brood horses in Ukraine and influence of anthelmintic treatments on strongylid community structure. *Veterinary Parasitology*, 154(3–4), 277–288. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.03.024>
- Kuzmina, T., Kharchenko, V., Zvegintsova, N., Zhang, L., & Liu, J. (2013). Strongylids (Nematoda: Strongylidae) in two zebra species from the “Askania-Nova” Biosphere Reserve, Ukraine: biodiversity and parasite community structure. *Helminthologia*, 50(3), 172–180. <https://doi.org/10.2478/s11687-013-0128-0>
- Kvapil, P., Kastelic, M., Dovc, A., Bártoová, E., Cížek, P., Lima, N., & Štrus, Š. (2017). An eight-year survey of the intestinal parasites of carnivores, hoofed mammals, primates, ratites and reptiles in the Ljubljana zoo in Slovenia. *Folia Parasitologica*, 64(013). <https://doi.org/10.14411/fp.2017.013>
- Lange, K. C., Olcott, D. D., Miller, J. E., Mosjidis, J. A., Terrill, T. H., Burke, J. M., & Kearney, M. T. (2006). Effect of sericea lespedeza (*Lespedeza cuneata*) fed as hay, on natural and experimental *Haemonchus contortus* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, 141(3–4), 273–278. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.06.001>
- Larone, D. H. (2011). *Medically Important Fungi: A Guide to Identification* (5th ed.). Washington DC: ASM Press.
- Larsen, M. (1999). Biological control of helminths. *International Journal for Parasitology*, 29(1), 139–146. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(98\)00185-4](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(98)00185-4)
- Larsen, M. (2000). Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predacious micro fungi. *Parasitology*, 120, 121–31.
- Larsen, M., Nansen, P., Grønvold, J., Wolstrup, J., & Henriksen, S. A. (1997). Biological control of gastro-intestinal nematodes - facts, future, or fiction? *Veterinary Parasitology*, 72, 479–

- Legesse, M., & Erko, B. (2004). Zoonotic intestinal parasites in *Papio anubis* (baboon) and *Cercopithecus aethiops* (vervet) from four localities in Ethiopia. *Acta Tropica*, 90(3), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2003.12.003>
- Levecke, B., Dorny, P., Vercammen, F., Visser, L. G., Van Esbroeck, M., Vercruysse, J., & Verweij, J. J. (2015). Transmission of *Entamoeba nuttalli* and *Trichuris trichiura* from Nonhuman Primates to Humans. *Emerging Infectious Diseases*, 21(10), 1871–1872. <https://doi.org/10.3201/eid2110.141456>
- Li, C. H., Cervantes, M., Springer, D. J., Boekhout, T., Ruiz-Vazquez, R. M., Torres-Martinez, S. R., ... Lee, S. C. (2011). Sporangiospore size dimorphism is linked to virulence of *Mucor circinelloides*. *PLoS Pathogens*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002086>
- Li, M., Zhao, B., Li, B., Wang, Q., Niu, L., Deng, J., ... Yang, G. (2015). Prevalence of gastrointestinal parasites in captive non-human primates of twenty-four zoological gardens in China. *Journal of Medical Primatology*, 44(3), 168–173. <https://doi.org/10.1111/jmp.12170>
- Lia, R. P., Traversa, D., Laricchiuta, P., Dantas-Torres, F., Paradies, R., Alvinerie, M., ... Otranto, D. (2010). Efficacy of an in-feed formulation containing ivermectin for the control of intestinal strongyles in captive zebras (*Equus burchelli* (Gray, 1824)). *Veterinary Parasitology*, 169(1–2), 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.12.028>
- Lichtenfels, J. R., Kharchenko, V. A., & Dvojnjos, G. M. (2008). Illustrated identification keys to strongylid parasites (strongylidae: Nematoda) of horses, zebras and asses (Equidae). *Veterinary Parasitology*, 156(1–2), 4–161. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.04.026>
- Lind, E. O., & Christensson, D. (2009). Anthelmintic efficacy on *Parascaris equorum* in foals on Swedish studs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 51(1), 45. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-45>
- Love, S., & Duncan, J. (1992). Development of cyathostome infection of helminth naïve foals. *Equine Vet Journal*, 13, 93–98.
- Lynsdale, C. L., dos Santos, D. J. F., Hayward, A. D., Mar, K. U., Htut, W., Aung, H. H., ... Lummaa, V. (2015). A standardised faecal collection protocol for intestinal helminth egg counts in Asian elephants, *Elephas maximus*. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4(3), 307–315. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2015.06.001>
- Lyons, E. T., Tolliver, S. C., Ionita, M., & Collins, S. S. (2008). Evaluation of parasitocidal activity of fenbendazole, ivermectin, oxibendazole, and pyrantel pamoate in horse foals with emphasis on ascarids (*Parascaris equorum*) in field studies on five farms in Central

- Kentucky in 2007. *Parasitology Research*, 103(2), 287–291. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0966-8>
- Lýsek, H., Fassatiová, O., Cuervo Pineda, N., & Lorenzo Hernández, N. (1982). Ovicidal fungi in soils of Cuba. *Folia Parasitologica*, 29(3), 265–70.
- Lýsek, H., & Stěrba, J. (1991). Colonization of *Ascaris lumbricoides* eggs by the fungus *Verticillium chlamydosporium* Goddard. *Folia Parasitologica*, 38(3), 255–259.
- Maciel, A. S., Freitas, L. G., Campos, A. K., Lopes, E. A., & Araújo, J. V. (2010). The biological control of *Ancylostoma* spp. dog infective larvae by *Duddingtonia flagrans* in a soil microcosm. *Veterinary Parasitology*, 173(3–4), 262–270. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.027>
- MacIntosh, A. J. J., Hernandez, A. D., & Huffman, M. A. (2010). Host age, sex, and reproductive seasonality affect nematode parasitism in wild Japanese macaques. *Primates*, 51(4), 353–364. <https://doi.org/10.1007/s10329-010-0211-9>
- Madeira de Carvalho, L. M. (2001). *Epidemiologia e controlo da estrongilidose em diferentes sistemas de produção equina em Portugal*. Tese de Doutoramento. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.
- Madeira de Carvalho, L. M., Alho, A. M., Marcelino, I., Flanagan, C., Silva, N., Pessoa, V., ... Paz-Silva, A. (2016). Parasites and Zoos: Major Agents and New Challenges for their Control. In *V Congresso Internacional FAUNA*.
- Madeira de Carvalho, L. M., Fazendeiro, M. I., & Afonso-Roque, M. M. (2008). Estudo Morfométrico das Larvas Infectantes (L3) dos Estrongilídeos (Nematoda: Strongylidae) dos Equídeos. 3. Conclusões , perspectivas futuras e proposta de chave de identificação de alguns nemátodes gastrintestinais mais comuns dos equídeos em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 15(2), 59–65.
- Madeira de Carvalho, L. M., Gillespie, A. T., Serra, P. M., Bernardo, F. A., & Farrim, A. P. (2007). Eficácia do fungo nematófago *Duddingtonia flagrans* no controlo biológico da estrongilidose equina no Ribatejo. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 102(563–564), 233–247.
- Madeira De Carvalho, L. M., Serra, P. M., Bernardo, F. A., Agrícola, R., Jorge, H., Farrim, A. P., ... Silva, A. P. (2011). Controlo integrado da estrongiloidose equina com anti-helmínticos associados ao fungo *Duddingtonia flagrans*. Aspectos da sua utilização em Portugal. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 18(1/2), 63–90.
- Maesano, G., Capasso, M., Ianniello, D., Cringoli, G., & Rinaldi, L. (2014). Parasitic infections detected by FLOTAC in zoo mammals from Warsaw, Poland. *Acta Parasitologica*, 59(2),



343–353. <https://doi.org/10.2478/s11686-014-0249-8>

Martin Bland, J., & Altman, D. G. (1986). Statistical Methods for Assessing Agreement Between Two Methods of Clinical Measurement. *The Lancet*, 327(8476), 307–310. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(86\)90837-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(86)90837-8)

Masters, N. J., & Flach, E. (2015). Tragulidae, Moschidae, and Cervidae. In R. E. Miller & M. E. Fowler (Eds.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Vol 8, pp. 611–625). St. Louis, Missouri: Elsevier.

Mati, V. L. T., Ferreira Junior, F. C., Pinto, H. A., & de Melo, A. L. (2013). Strongyloides cebus (Nematoda: Strongyloididae) in *Lagothrix cana* (Primates: Atelidae ) from the Brazilian Amazon : Aspects of clinical presentation , anatomopathology , treatment and parasitic biology. *The Journal of Parasitology*, 99(6), 1009–18.

Maurelli, M. P., Rinaldi, L., & Cringoli, G. (2016). Standard operating procedures for Mini-FLOTAC. In *Principal Investigator Meeting – STARWORMS* (pp. 1–64).

Melfi, V., & Poyser, F. (2007). Trichuris burdens in zoo-housed *Colobus guereza*. *International Journal of Primatology*, 28(6), 1449–1456. <https://doi.org/10.1007/s10764-007-9206-9>

Mendoza-De Gives, P., Zapata Nieto, C., Liebano Hernández, E., López Arellano, M. E., Rodríguez, D. H., & Garduño, R. G. (2006). Biological Control of Gastrointestinal Parasitic Nematodes Using *Duddingtonia flagrans* in Sheep under Natural Conditions in Mexico. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1081(1), 355–359. <https://doi.org/10.1196/annals.1373.050>

Miguélez Riádigos, S., Sol Arias Vázquez, M., Valderrábano Cano, E., Piñeiro Fraga, P., Gómez Uzal, D., Fernández Marcos, M., ... Manuel Madeira de Carvalho, L. (2014). Control Biológico de Nematodos Parásitos en Antílopes (*Cervicapra cervicapra*) en Cautividad. *Pastagens e Forragens*, 34, 47–56.

Modrý, D., Hofmannová, L., Mihalca, A. D., Juránková, J., Neumayerová, H., & D'Amico, G. (2017). *Field and Laboratory diagnostics of parasitic diseases of domestic animals : from sampling to diagnosis*.

Monte Selvagem. (2018). O Parque | Monte Selvagem. Retirado de <http://monteselvagem.pt/o-parque/>

Morgan, M., Behnke, J. M., Lucas, J., & Peberdy, J. F. (1997). In vitro assessment of the influence of nutrition, temperature and larval density on trapping of the infective larvae of *Heligmosomoides polygyrus* by *Arthrobotrys oligospora*, *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium megalosporum*. *Parasitology*, 115(3), 303–310. <https://doi.org/10.1017/S0031182097001297>

- Munene, E., Otsyula, M., Mbaabu, D. A. ., Mutahi, W. ., Muriuki, S. M. ., & Muchemi, G. . (1998). Helminth and protozoan gastrointestinal tract parasites in captive and wild-trapped African non-human primates. *Veterinary Parasitology*, 78(3), 195–201. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(98\)00143-5](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(98)00143-5)
- Mutani, A., Rhynd, K., & Brown, G. (2003). A preliminary investigation on the gastrointestinal helminths of the Barbados green monkey, *Cercopithecus aethiops sabaesus*. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 45(4), 193–195. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000400003>
- Nansen, P., Larsen, M., Roepstorff, A., Grønvold, J., Wolstrup, J., & Henriksen, S. A. (1996). Control of *Oesophagostomum dentatum* and *Hyostrongylus rubidus* in outdoor-reared pigs by daily feeding with the microfungus *Duddingtonia flagrans*. *Parasitology Research*, 82(7), 580–584. <https://doi.org/10.1007/s004360050168>
- Narat, V., Guillot, J., Pennec, F., Lafosse, S., Grüner, A. C., Simmen, B., ... Krief, S. (2015). Intestinal Helminths of Wild Bonobos in Forest-Savanna Mosaic: Risk Assessment of Cross-Species Transmission with Local People in the Democratic Republic of the Congo. *EcoHealth*, 12(4), 621–633. <https://doi.org/10.1007/s10393-015-1058-8>
- Noel, M. L., Scare, J. A., Bellaw, J. L., & Nielsen, M. K. (2017). Accuracy and Precision of Mini-FLOTAC and McMaster Techniques for Determining Equine Strongyle Egg Counts. *Journal of Equine Veterinary Science*, 48, 182–187.e1. <https://doi.org/10.1016/j.jevs.2016.09.006>
- Nordbring-Hertz, B., Jansson, H.-B., & Tunlid, A. (2006). Nematophagous Fungi. In *Els*. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1038/npg.els.0004293>
- Nosal, P., Kowal, J., Kornas, S., Wyrobisz, A., Skotnicki, J., Basiaga, M., & Plucinska, N. E. (2016). Endoparasites of exotic ungulates from the Giraffidae and Camelidae families kept *ex situ*. *Annals of Parasitology*, 62(1), 67–70. <https://doi.org/10.17420/ap6201.34>
- O'Connor, L. J., Walkden-Brown, S. W., & Kahn, L. P. (2006). Ecology of the free-living stages of major trichostrongylid parasites of sheep. *Veterinary Parasitology*, 142(1–2), 1–15. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.035>
- Palomero Salinero, A. M., Hernández, J. A., Balán, F. A., Silva, M. I., Paz-silva, A., Sol, M., & Vázquez, A. (2018). Implementation of Biological Control to the Integrated Control of Strongyle Infection among Wild Captive Equids in a Zoological Park. *BioMed Research International*, 2018.
- Palomero Salinero, A. M. (2015). *Análisis de la Eficacia de Hongos frente a Parásitos que afectan a la Gallina Ponedora*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lugo:

- Panayotova-Pencheva, M. S. (2013). Parasites in Captive Animals: A Review of Studies in Some European Zoos. *Zoologische Garten*, 82(1–2), 60–71. <https://doi.org/10.1016/j.zoolgart.2013.04.005>
- Parassitologia Veterinaria. (2018). Practical Technical Instructions | Mini-FLOTAC. Retirado de <http://www.parassitologia.unina.it/flotac/mini-flotac/practical-technical-instructions/>
- Pérez Cordón, G., Hitos Prados, A., Romero, D., Sánchez Moreno, M., Pontes, A., Osuna, A., & Rosales, M. J. (2008). Intestinal parasitism in the animals of the zoological garden “Peña Escrita” (Almuñecar, Spain). *Veterinary Parasitology*, 156(3–4), 302–309. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2008.05.023>
- Pinto, H. A., Ferreira Junior, F. C., Mati, V. L. T., & de Melo, A. L. (2013). *Trypanoxyuris* (*Paraoxyuronema*) *lagothricis* (Nematoda: Oxyuridae) em *Lagothrix cana* (Primates: Atelidae) no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(2), 307–311. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013005000021>
- Proudman, C. J., & Matthews, J. B. (2000). Control of Intestinal Parasites in Horses. *In Practice*, 22, 90–97.
- Pullan, R. L., Smith, J. L., Jasrasaria, R., & Brooker, S. J. (2014). Global numbers of infection and disease burden of soil transmitted helminth infections in 2010. *Parasites and Vectors*, 7(1), 37. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-37>
- Raghukumar, S. (2017). Fungi: Characteristics and Classification. In *Fungi in Coastal and Oceanic Marine Ecosystems* (pp. 1–13). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-54304-8>
- Reichard, M. V., Wolf, R. F., Clingenpeel, L. C., Doan, S. K., Jones, A. N., & Gray, K. M. (2008). Efficacy of fenbendazole formulated in a commercial primate diet for treating specific pathogen-free baboons (*Papio cynocephalus anubis*) infected with *Trichuris trichiura*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 47(6), 51–55.
- Reichard, M. V., Wolf, R. F., Carey, D. W., Garrett, J. J., & Briscoe, H. A. (2007). Efficacy of Fenbendazole and Milbemycin Oxime for Treating Baboons (*Papio cynocephalus anubis*) Infected with *Trichuris trichiura*. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 46(2), 42–45.
- Reinemeyer, C. R. (2009). Diagnosis and control of anthelmintic-resistant *Parascaris equorum*. *Parasites and Vectors*, 2(2). <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S2-S8>
- Reis, C. E. R., Hu, B., & Zhang, J. (2011). Direct biodiesel production from *Mucor circinelloides*

- fungi. In *11AChE - 2011 AChE Annual Meeting, Conference Proceedings*.
- Ribes, J. A., Vanover-Sams, C. L., & Baker, D. J. (2000). Zygomycetes in human disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 13(2), 236–301. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.2.236-301.2000>
- Rickard, L. G. (1993). Parasitic gastritis in a llama (*Lama glama*) associated with inhibited larval *Teladorsagia* spp. (Nematoda: Trichostrongyloidea). *Veterinary Parasitology*, 45(3–4), 331–335.
- Sagüés, M. F., Fusé, L., Fernández, A., Iglesias, L., Moreno, F., & Saumell, C. (2011). Efficacy of an energy block containing *Duddingtonia flagrans* in the control of gastrointestinal nematodes of sheep. *Parasitology Research*, 109(3), 707–713. <https://doi.org/10.1007/s00436-011-2302-y>
- Sagüés, M. F., Purslow, P., Fernández, S., Fusé, L., Iglesias, L., & Saumell, C. (2011). Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología*, 28(4), 143–147. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.06.009>
- Santos, D. J. F. dos. (2013). *Caracterização do Parasitismo de Ungulados Silvestres e aspectos da sua Epidemiologia na Tapada Nacional de Mafra , Concelho de Mafra , Portugal*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa.
- Santurio, J. M., Zanette, R. A., Da Silva, A. S., De La Rue, M. L., Monteiro, S. G., & Alves, S. H. (2009). Improved method for *Duddingtonia flagrans* chlamydospores production for livestock use. *Veterinary Parasitology*, 164(2–4), 344–346. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2009.05.012>
- Sato, H., Une, Y., & Takada, M. (2005). High incidence of the gullet worm, *Gongylonema pulchrum*, in a squirrel monkey colony in a zoological garden in Japan. *Veterinary Parasitology*, 127(2), 131–137. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.10.005>
- Saumell, C. A., Fernández, A. S., Echevarria, F., Gonçalves, I., Iglesias, L., Sagüés, M. F., & Rodríguez, E. M. (2016). Lack of negative effects of the biological control agent *Duddingtonia flagrans* on soil nematodes and other nematophagous fungi. *Journal of Helminthology*, 90(6), 706–711. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1500098X>
- Schougaard, H., & Nielsen, M. K. (2007). Apparent ivermectin resistance of *Parascaris equorum* in foals in Denmark. *Veterinary Record*, 160(13), 439–440. <https://doi.org/10.1136/vr.160.13.439>
- Serna-Jiménez, J. A., Quintanilla-Carvajal, M. X., Rodríguez, J. M., Uribe, M. A., & Klotz, B.

- (2016). Development of a combined temperature and pH model and the use of bioprotectants to control of *Mucor circinelloides*. *American Journal of Food Technology*, 11(1–2), 21–28. <https://doi.org/10.3923/ajft.2016.21.28>
- Silva, A. R., Araújo, J. V., Braga, F. R., Alves, C. D. F., & Frassy, L. N. (2010). In vitro ovicidal activity of the nematophagous fungi *Duddingtonia flagrans*, *Monacrosporium thaumasium* and *Pochonia chlamydosporia* on *Trichuris vulpis* eggs. *Veterinary Parasitology*, 172(1–2), 76–79. <https://doi.org/10.1016/J.VETPAR.2010.04.034>
- Silva, A. R., Araújo, J. V., Braga, F. R., Benjamim, L. A., Souza, D. L., & Carvalho, R. O. (2011). Comparative analysis of destruction of the infective forms of *Trichuris trichiura* and *Haemonchus contortus* by nematophagous fungi *Pochonia chlamydosporia*; *Duddingtonia flagrans* and *Monacrosporium thaumasium* by scanning electron microscopy. *Veterinary Microbiology*, 147(1–2), 214–219. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.06.019>
- Slocombe, J. O. D., Gannes, R. V. G., & Lake, M. C. (2007). Macrocyclic lactone-resistant *Parascaris equorum* on stud farms in Canada and effectiveness of fenbendazole and pyrantel pamoate. *Veterinary Parasitology*, 145(3–4), 371–376. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.008>
- Solórzano-García, B., & Pérez-Ponce de León, G. (2017). Helminth parasites of howler and spider monkeys in Mexico: Insights into molecular diagnostic methods and their importance for zoonotic diseases and host conservation. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 6(2), 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2017.04.001>
- Spatafora, J. W., Chang, Y., Benny, G. L., Lazarus, K., Smith, M. E., Berbee, M. L., ... Stajich, J. E. (2016). A phylum-level phylogenetic classification of zygomycete fungi based on genome-scale data. *Mycologia*, 108(5), 1028–1046. <https://doi.org/10.3852/16-042>
- Stirling, G. R., & West, L. M. (1991). Fungal parasites of root-knot nematodes eggs from tropical and sub tropical regions of Austrália. *Australas Plant Pathol*, 20, 149–154.
- Strait, K., Else, J. G., & Eberhard, M. L. (2012). Parasitic Diseases of Nonhuman Primates. In C. R. Abee, K. Mansfield, S. Tardif, & T. Morris (Eds.), *Nonhuman Primates in Biomedical Research. Volume 2: Diseases* (2nd ed.). London: Elsevier.
- Sutherland-Smith, M. (2015). Suidae and Tayassuidae (Wild Pigs, Peccaries). In R. E. Miller & M. E. Fowler (Eds.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Vol 8, pp. 568–583). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Taylor, M. A., Coop, R. L., & Wall, R. L. (2016). *Veterinary Parasitology*. (M. A. Taylor, R. L.

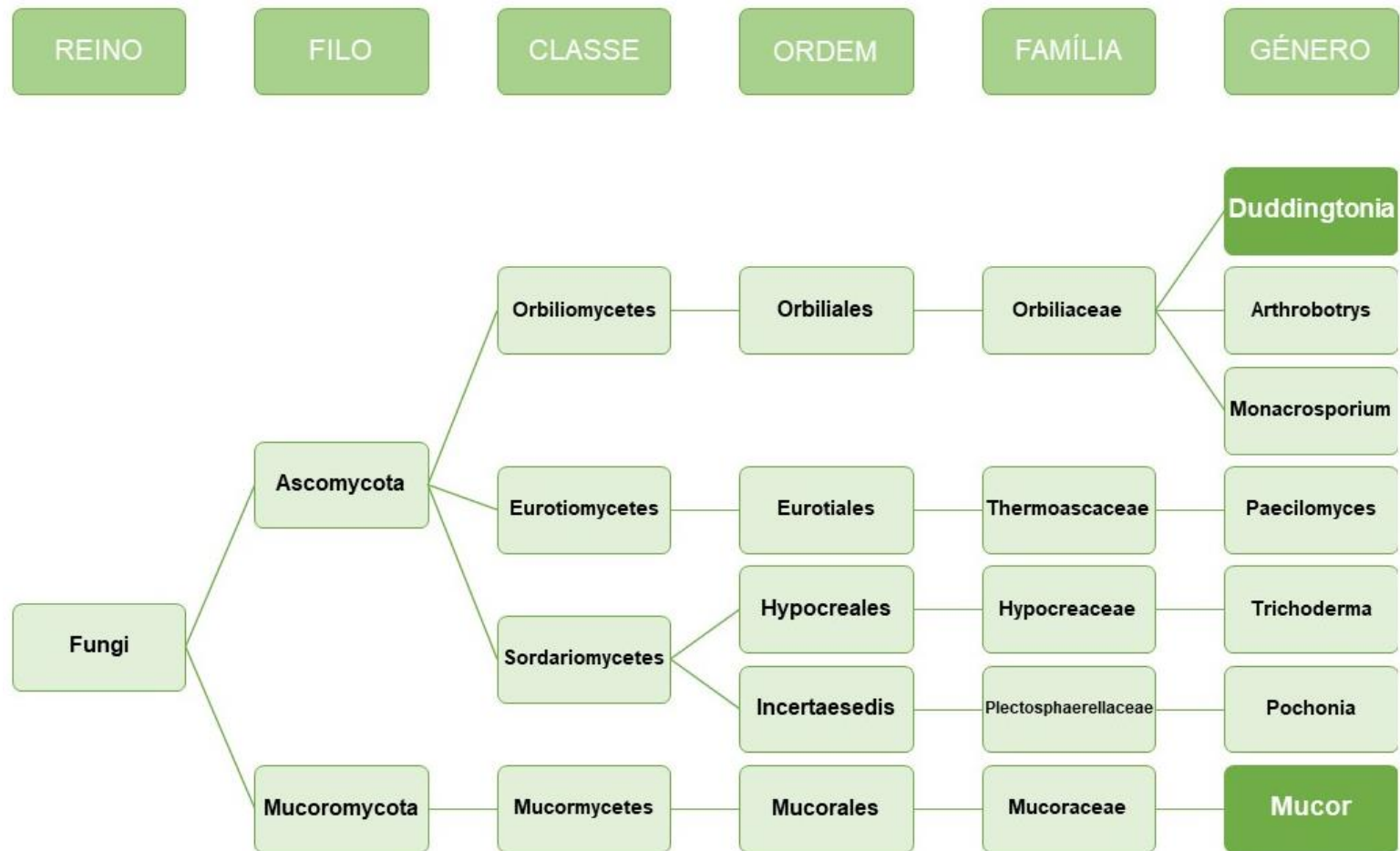
- Coop, & R. L. Wall, Eds.) (4th ed.). Oxford: Wiley-Blackwell.
- Terio, K. A., Lonsdorf, E. V., Kinsel, M. J., Raphael, J., Lipende, I., Collins, A., ... Gillespie, T. R. (2018). Oesophagostomiasis in non-human primates of Gombe National Park, Tanzania. *American Journal of Primatology*, 80(1), e22572. <https://doi.org/10.1002/ajp.22572>
- Terrill, T. H., Dykes, G. S., Shaik, S. A., Miller, J. E., Kouakou, B., Kannan, G., ... Mosjidis, J. A. (2009). Efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats: Dose titration study. *Veterinary Parasitology*, 163(1–2), 52–56. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.04.022>
- Terrill, T. H., Mosjidis, J. A., Moore, D. A., Shaik, S. A., Miller, J. E., Burke, J. M., ... Wolfe, R. (2007). Effect of pelleting on efficacy of sericea lespedeza hay as a natural dewormer in goats.pdf. *Veterinary Parasitology*, 146(1–2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.02.005>
- Traversa, D., Von Samson-Himmelstjerna, G., Demeler, J., Milillo, P., Schürmann, S., Barnes, H., ... Cobb, R. (2009). Anthelmintic resistance in cyathostomin populations from horse yards in Italy, United Kingdom and Germany. *Parasites and Vectors*, 2. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-S2-S2>
- Turner, W. C., & Getz, W. M. (2013). Seasonal and Demographic Factors Influencing Gastrointestinal Parasitism in Ungulates of Etosha National Park. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(4), 1108–1119. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.4.1108>
- Van Wyk, J. A., Cabaret, J., & Michael, L. M. (2004). Morphological identification of nematode larvae of small ruminants and cattle simplified. *Veterinary Parasitology*, 119(4), 277–306. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.11.012>
- Veronesi, F., Fioretti, D. P., & Genchi, C. (2010). Are macrocyclic lactones useful drugs for the treatment of *Parascaris equorum* infections in foals? *Veterinary Parasitology*, 172(1–2), 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.04.019>
- Vilela, V. L. R., Feitosa, T. F., Braga, F. R., Araújo, J. V. de, Souto, D. V. de O., Santos, H. E. da S., ... Athayde, A. C. R. (2012). Biological control of goat gastrointestinal helminthiasis by *Duddingtonia flagrans* in a semi-arid region of the northeastern Brazil. *Veterinary Parasitology*, 188(1–2), 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.018>
- Waller, P. J., Faedo, M., & Ellis, K. (2001). The potential of nematophagous fungi to control the free- living stages of nematode parasites of sheep: towards the development of a fungal controlled release device. *Vet Parasitol*, 102(4), 299–308. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00545-3](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00545-3)

- Waller, P. J., Knox, M. R., & Faedo, M. (2001). The potential of nematophagous fungi to control the free-living stages of nematode parasites of sheep: Feeding and block studies with *Duddingtonia flagrans*. *Veterinary Parasitology*, 102(4), 321–330. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00542-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00542-8)
- Whitney, R. (1974). Metazoan Parasites of Nonhuman Primates. *Toxicologic Pathology*, 2(1), 15–19. <https://doi.org/10.1177/019262337400200106>
- Wolfe, B. (2015). Bovidae (Except Sheep and Goats) and Antilocapridae. In R. E. Miller (Ed.), *Fowler's Zoo and Wild Animal Medicine* (Vol 8, pp. 626–644). St. Louis, Missouri: Elsevier.
- Wren, B. T., Gillespie, T. R., Camp, J. W., & Remis, M. J. (2015). Helminths of Vervet Monkeys, *Chlorocebus aethiops*, from Loskop Dam Nature Reserve, South Africa. *Comparative Parasitology*, 82(1), 101–108. <https://doi.org/10.1654/4712RR.1>
- Yao, C., Walkush, J., Shim, D., Cruz, K., & Ketzis, J. (2017). Molecular species identification of *Trichuris trichiura* in African green monkey on St. Kitts, West Indies. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 11(November), 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.11.004>
- Young, K. E., Jensen, J. M., & Craig, T. M. (2000). Evaluation of anthelmintic activity in captive wild ruminants by fecal egg reduction tests and a larval development assay. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine: Official Publication of the American Association of Zoo Veterinarians*, 31(3), 348–52. [https://doi.org/10.1638/1042-7260\(2000\)031\[0348:EOAIC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1638/1042-7260(2000)031[0348:EOAIC]2.0.CO;2)
- Zanzani, S. A., Gazzonis, A. L., Epis, S., & Manfredi, M. T. (2016). Study of the gastrointestinal parasitic fauna of captive non-human primates (*Macaca fascicularis*). *Parasitology Research*, 115(1), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4748-9>

## XI. ANEXOS

### Anexo 1 – Taxonomia dos Principais Géneros de Fungos Nematófagos Utilizados Como Controlo Biológico

**Figura 20** - Organização taxonómica dos principais géneros de fungos nematófagos implicados no controlo biológico (Raghukumar, 2017; Spatafora et al., 2016)





## Anexo 2 – Espécies de Mamíferos Presentes no Parque Zoológico “Monte Selvagem – Reserva Animal”

**Tabela 14** - Espécies de mamíferos presentes no Parque Zoológico "Monte Selvagem – Reserva Animal" e respetivos tipos de instalação e alimentação (sombreado a verde encontram-se as espécies que participaram no estudo com fungos nematófagos)

Ordem	Família	Nome Científico	Nome Comum	Tipo de Instalação	Tipo de Alimentação
Artiodactyla	Camelidae	<i>Lama glama</i>	Lama	Instalação mista, ao ar livre, com outras espécies de mamíferos e aves	1 refeição diária: ração de ruminantes 1 a 2x por semana: fruta/legumes Feno à disposição
	Bovidae	<i>Bos grunniens</i>	Iaque	Instalação mista ao ar livre, partilhada com outras espécies de mamíferos e aves	1 refeição diária: ração de ruminantes 1 a 2x por semana: fruta/legumes Feno à disposição
		<i>Taurotragus oryx</i>	Elande		
		<i>Antilope cervicapra</i>	Cervicapra		
		<i>Kobus leche</i>	Cobus		
		<i>Bos taurus</i>	Watussi	Instalação mista ao ar livre, partilhada com outras espécies de mamíferos e aves, com zona de proteção separada por espécies	
		<i>Capra hircus</i>	Cabra Anã		
		<i>Ovis spp.</i>	Ovelha		
	Cervidae	<i>Dama dama</i>	Gamo	Instalação mista ao ar livre, partilhada com outras espécies de mamíferos e aves	1 refeição diária: fruta/legumes + ração ruminantes Feno à disposição
		<i>Axis axis</i>	Chital		
		<i>Elaphurus davidianus</i>	Veado do Padre David		
		<i>Rangifer tarandus</i>	Rena	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	
	Suidae	<i>Sus scrofa</i>	Javali	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	1 refeição diária: milho demolhado (ou outro cereal) + fruta/legumes
		<i>Sus bucculentus</i>	Porco do Vietname	Instalação mista, ao ar livre, com outras espécies de mamíferos e aves	
	Tayassuidae	<i>Pecari tajacu</i>	Pecari de Colar	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	

Perissodactyla	Equidae	<i>Equus burchellii</i>	Zebra da Planície	Instalação mista, ao ar livre, com outras espécies de mamíferos e aves	1 refeição diária: ração 1 a 2x por semana: fruta/legumes Feno à disposição
		<i>Equus asinus</i>	Burro	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	1 a 2x por semana: fruta/legumes Feno à disposição
Primates	Cercopithecidae	<i>Macaca silenus</i>	Macaco Cauda de Leão	Instalação interior e instalação exterior	2 refeições diárias: fruta/legumes + ração “Non Human Primates” (NHP)/ovo/iogurte/gelatina/arroz/massa
		<i>Macaca fuscata</i>	Macaco-do-Japão	Instalação interior e instalação exterior com proteção de rede	2 refeições diárias: fruta/legumes + ração NHP/ovo/iogurte/gelatina/arroz/massa
		<i>Chlorocebus aethiops</i>	Macaco-de-Tarrafe	Instalação interior e instalação exterior com proteção de rede	2 refeições diárias: fruta/legumes + ração NHP/ovo/iogurte/gelatina/arroz/massa
		<i>Macaca nemestrina</i>	Macaco Rabo de Porco	Instalação interior e instalação exterior com proteção de rede	2 refeições diárias: fruta/legumes + ração NHP/ovo/iogurte/gelatina/arroz/massa
	Cebidae	<i>Callithrix jacchus</i>	Saguis-de-Tufo-Branco	Instalação interior	2 refeições diárias: fruta + ração “New World Primates” (NWP)
	Lemuridae	<i>Lemur catta</i>	Lémure-de-Cauda-Anelada	Instalação interior e instalação exterior com proteção de rede	2 refeições diárias: fruta/legumes + ração NWP
Diprotodontia	Macropodidae	<i>Macropus rufogriseus</i>	Canguru de Bennet	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	1 refeição diária: ração de coelho + ração de aves

Carnívora	Procyonidae	<i>Procyon lotor</i>	Guaxini	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	1 refeição diária: fruta + carne/peixe/ovo/ração de cão ou gato
		<i>Nasua nasua</i>	Coati	Instalação interior e instalação exterior com proteção de rede	2 refeições diárias: fruta/legumes + carne/ovo/ração de cão
	Herpestidae	<i>Suricata suricatta</i>	Suricata	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	2 refeições diárias: fruta/legumes + carne/ovo/ração/tenébrios
Rodentia	Hystriidae	<i>Hystrix africaeaustralis</i>	Porco-Espinho	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	1 refeição diária: milho demolhado (ou outro cereal) + fruta/legumes
	Caviidae	<i>Dolichotis patagonum</i>	Lebre da Patagónia	Instalação ao ar livre, com zona de proteção das condições meteorológicas	1 refeição diária: ração de coelho Feno à disposição
		<i>Cavia porcellus</i>	Porquinho da Índia	Instalação coberta, com acesso a zona exterior	1 refeição diária: ração de coelho + ração de aves

**Anexo 3 – Valores de OPG obtidos através das técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC para cada amostra positiva do presente estudo**

**Tabela 15** - Valores de OPG obtidos através das técnicas de McMaster e Mini-FLOTAC para cada amostra positiva do presente estudo

<b>Amostra</b>	<b>McMaster</b>	<b>McMaster log<sup>10</sup></b>	<b>Mini-FLOTAC</b>	<b>Mini-FLOTAC log<sup>10</sup></b>
Tarrafe 1	0	0	20	1,32
Tarrafe 2	0	0	150	2,18
Tarrafe 3	2850	3,45	660	2,82
Tarrafe 4	1800	3,26	1180	3,07
Tarrafe 5	800	2,9	1210	3,08
Tarrafe 6	1075	3,03	1325	3,12
Tarrafe 7	650	2,81	820	2,91
Tarrafe 8	850	2,93	500	2,7
Tarrafe 9	500	2,7	480	2,68
Tarrafe 10	400	2,6	160	2,21
Tarrafe 11	100	2	100	2
Tarrafe 12	200	2,3	20	1,32
Tarrafe 13	50	1,71	20	1,32
Tarrafe 14	0	0	80	1,91
Tarrafe 15	300	2,48	780	2,89
Tarrafe 16	500	2,7	610	2,79
Tarrafe 17	0	0	10	1,04
Tarrafe 18	200	2,3	100	2
Tarrafe 19	650	2,81	620	2,79
Tarrafe 20	50	1,71	70	1,85
Tarrafe 21	100	2	60	1,79
Tarrafe 22	250	2,4	320	2,51
Lama 1	50	1,71	270	2,43
Lama 2	50	1,71	80	1,91
Lama 3	50	1,71	210	2,32
Lama 4	50	1,71	80	1,91

Lama 5	50	1,71	40	1,61
Lama 6	0	0	75	1,88
Lama 7	300	2,48	50	1,71
Lama 8	0	0	45	1,66
Lama 9	0	0	20	1,32
Zebra 1	0	0	90	1,96
Zebra 2	450	2,65	150	2,18
Zebra 3	750	2,88	200	2,3
Zebra 4	1450	3,16	610	2,79
Zebra 5	0	0	10	1,04
Zebra 6	510	2,71	230	2,36
Zebra 7	2050	3,31	1130	3,05
Zebra 8	750	2,88	105	2,03
Zebra 9	150	2,18	130	2,12
Zebra 10	0	0	105	2,03
Zebra 11	250	2,4	105	2,03
Zebra 12	0	0	75	1,88
Zebra 13	50	1,71	50	1,71
Zebra 14	0	0	15	1,2
Zebra 15	0	0	10	1,04
Zebra 16	0	0	100	2
Zebra 17	150	2,18	30	1,49
Zebra 18	50	1,71	25	1,41
Zebra 19	0	0	60	1,79
Zebra 20	500	2,7	110	2,05
Zebra 21	350	2,55	100	2
Zebra 22	200	2,3	40	1,61
Zebra 23	450	2,65	110	2,05
Zebra 24	100	2	75	1,88
Zebra 25	700	2,85	145	2,16
Elande 1	0	0	300	2,48

Elande 2	100	2	50	1,71
Elande 3	150	2,18	60	1,79
Elande 4	50	1,71	10	1,04
Elande 5	50	1,71	125	2,1
Rabo Porco	50	1,71	0	0
Cervicapra	100	2	60	1,79
Kobus	0	0	30	1,49
Ovelha	0	0	90	1,96
Porco Espinho	200	2,3	3	0,6
Lebre Patagonia	150	2,18	100	2
Porquinho India	150	2,18	20	1,32

## Anexo 4 – Poster intitulado “Eficácia do fungo nematófago *Mucor circinelloides* no controlo de nematodes gastrointestinais presentes em fezes de macacos-de-tarrafe (*Chlorocebus aethiops*)” apresentado nas XI Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora

**Figura 21** - Poster intitulado “Eficácia do fungo nematófago *Mucor circinelloides* no controlo de nematodes gastrointestinais presentes em fezes de macacos-de-tarrafe (*Chlorocebus aethiops*)” apresentado nas XI Jornadas do Hospital Veterinário Muralha de Évora

### EFICÁCIA DO FUNGO NEMATÓFAGO *Mucor circinelloides* NO CONTROLO DE NEMATODES GASTROINTESTINAIS PRESENTES EM FEZES DE MACACOS-DE-TARRAFE (*Chlorocebus aethiops*)



Reis, R.<sup>1</sup>, Palomero, A.<sup>2</sup>, Gomes, L.<sup>1</sup>, Gouveia, J.<sup>3</sup>, Prates, N.<sup>3,4</sup>, Paz-Silva, A.<sup>2</sup>,  
Madeira de Carvalho, L.M.<sup>1\*</sup>



1. CIISA - Centro de Investigação Interdisciplinar em Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de Lisboa, Av. Universidade Técnica, 1300-477 Lisboa, Portugal; 2. COPAR - Grupo para el Control Parasitario, Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, 27002-Lugo, Espanha; 3. Monte Selvagem – Reserva Animal, Monte do Azinhal, Lave 7050 Montemor-o-Novo, Portugal; 4. Hospital Veterinário Muralha de Évora, Rua Marechal Costa Gomes, 9, 7005-145 Évora, Portugal. \*Autor apresentador: madeirade Carvalho@fmv.ulisboa.pt

#### INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

Os nematodes gastrointestinais (NGI) constituem um problema constante nos mamíferos selvagens mantidos em cativeiro em Parques Zoológicos<sup>1</sup>. Com o aumento das resistências aos anti-helmínticos, torna-se cada vez mais importante que os Parques Zoológicos (PZs) disponham de medidas alternativas eficazes de controlo parasitário. O Controlo Biológico consiste no controlo de pragas utilizando antagonistas naturais<sup>2</sup>. Os fungos nematófagos, como *Mucor circinelloides*, constituem um grupo que tem vindo a ser estudado<sup>3</sup> e com grandes perspectivas de ser usado no controlo biológico das helmintoses em PZs<sup>4,5,6</sup>. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de *Mucor circinelloides* na redução de ovos de NGI presentes nas fezes de macacos-de-tarrafe (*Chlorocebus aethiops*) mantidos em cativeiro (Fig. 1).



Fig. 1 – Macaco-de-tarrafe

#### MATERIAL E MÉTODOS

Nos meses de Dezembro 2017 e Abril 2018 foram colhidas amostras fecais num grupo de 8 macacos-de-tarrafe. Os primatas passavam a noite numa instalação fechada e pela manhã era colhida uma amostra de grupo de fezes, conservada em refrigeração e analisada no máximo 3 dias pós colheita através das técnicas coprológicas quantitativas McMaster e Mini-FLOTAC (Fig. 2)<sup>7,8,9</sup>. Em Maio 2018 foi realizado um ensaio em caixas (Fig. 3) tentando recriar as condições naturais em que as fezes e os parasitas se encontram submetidos em presença dos fungos nematófagos<sup>10</sup>. Para o efeito, foram novamente colhidas amostras de fezes, selecionada a que apresentava um valor de ovos por grama de fezes (OPG) mais elevado e criados dois grupos de caixas: Grupo Fungos e Grupo Controlo. O primeiro consistia em 8 caixas de plástico contendo 5 g de fezes e 1 ml suspensão fúngica de *Mucor circinelloides* ( $1,5 \times 10^6$  esporos/ml) (Fig. 4) e o segundo consistia em 8 caixas contendo apenas 5g de fezes. Estas caixas foram colocadas no exterior, numa zona com vegetação, sujeitas a variações de temperatura, humidade e luminosidade durante 4 semanas (Fig. 5). As caixas foram pulverizadas com água regularmente para evitar a dessecação natural das fezes. A cada semana eram retiradas 2 caixas de cada grupo e analisadas em laboratório através das técnicas coprológicas quantitativas McMaster e Mini-FLOTAC, para visualizar as alterações provocadas pelos fungos nos ovos e obter os valores de OPG que permitiriam o cálculo das Taxas de Redução (%):  $\text{Taxa de Redução (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{Média OPG Grupo Fungos}}{\text{Média OPG Grupo Controlo}} \right) \times 100$ . As diferenças entre os grupos Fungos e Controlo foram avaliadas através do teste “Welch Two Sample T-Test” e “Wilcoxon Rank Sum Test”, através do programa “The R Foundation for Statistical Computing version 3.5.1”. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas para valores de  $p < 0,05$ .

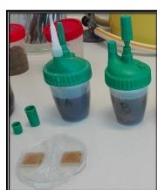


Fig. 2 – Técnica da Mini-FLOTAC

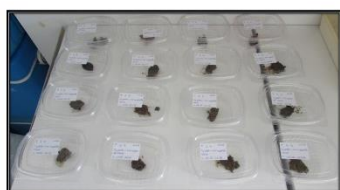


Fig. 3 – Caixas com fezes de macacos-de-tarrafe



Fig. 4 – Contagem de esporos em suspensão fúngica de *Mucor circinelloides*



Fig. 5 – Ensaio em caixas realizado em ambiente natural

#### RESULTADOS

Nos rastreios realizados em Dezembro e Abril apenas foram detetados ovos de *Trichuris* sp. (Fig. 6). As contagens realizadas no mês de Abril apresentaram valores de OPG muito superiores às realizadas no mês de Dezembro. No ensaio em caixas verificou-se a existência de uma diferença estatisticamente significativa entre o grupo Controlo e o grupo Fungos ao longo das quatro semanas do estudo, tanto para os resultados obtidos através da técnica de McMaster ( $p = 0,04586$ ), como através da técnica da Mini-FLOTAC ( $p = 0,03689$ ). As taxas de redução obtidas foram sempre superiores a 45% em todas as semanas, exceto para as contagens obtidas na segunda semana com a técnica da Mini-FLOTAC. As maiores taxas de redução verificaram-se nas semanas 2 e 3 e em média a redução global ao fim das 4 semanas de ensaio foi de 63,8% e 51,3%, consoante os valores de OPG foram obtidos através de McMaster ou Mini-FLOTAC, respetivamente (Fig. 8, 9 e 10).

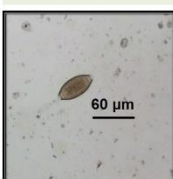


Fig. 6 – Ovo de *Trichuris* sp. viável em fezes de macaco-de-tarrafe

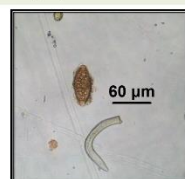


Fig. 7 – Ovo de *Trichuris* sp. inviable com aderências na cápsula e o embrião morfológicamente alterado

Técnica	Semana	Média OPG Controlo	Média OPG Fungos	Taxa de Redução (%)
McMaster	1	750	400	47%
	2	150	25	83%
	3	400	100	75%
	4	350	175	50%
Mini-FLOTAC	1	660	320	51%
	2	60	50	17%
	3	695	55	92%
	4	345	190	45%

Fig. 8 – Resultados do ensaio em caixas com o fungo *Mucor circinelloides* e ovos de *Trichuris* sp. em fezes de macaco-de-tarrafe

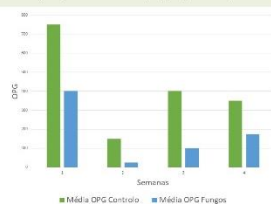


Fig. 9 – Comparação entre os resultados obtidos entre o grupo Controlo e o grupo Fungos (técnica de McMaster)

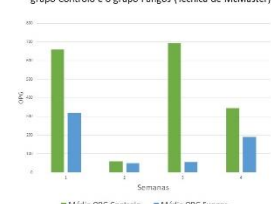


Fig. 10 – Comparação entre os resultados obtidos entre o grupo Controlo e o grupo Fungos (técnica da Mini-FLOTAC)

#### DISCUSSÃO E PRINCIPAIS CONCLUSÕES

A presença de *Trichuris* sp. em primatas mantidos em cativeiro é bastante frequente<sup>7</sup>. O ciclo de vida direto fecal-oral, a sua grande resistência aos fatores ambientais e, no caso concreto deste estudo, a possibilidade de acesso dos animais a uma área exterior com vegetação na qual as fezes não são recolhidas diariamente, são fatores que justificam a sua grande persistência no ambiente, apesar da realização de desparasitações com anti-helmínticos convencionais. Sendo este um parasita potencialmente zoonótico, sobretudo em crianças, o seu controlo eficaz em PZs é bastante importante. Após a realização do ensaio em caixas e associando as elevadas taxas de redução existentes com a visualização ao microscópio de alterações nos ovos provocadas pelo fungo (Fig. 7), é possível demonstrar a eficácia de *Mucor circinelloides* no controlo parasitário de ovos de *Trichuris* sp. A eficácia deste fungo em NGI de outras espécies de mamíferos selvagens em cativeiro também já foi demonstrada<sup>4,5,6</sup>. Deste modo, a utilização deste fungo nas instalações de PZs ou a sua administração oral aos animais poderá ser uma solução para um melhor controlo parasitário no futuro, com uma redução da frequência de utilização de fármacos anti-helmínticos, retardando assim o aparecimento de resistências e diminuindo a contaminação ambiental provocada por estes.

#### REFERÊNCIAS

1. Panopoulou-Petrouleou, M. S. (2013). Parasites in Captive Animals: A Review of Studies in Some European Zoos. *Zoologische Garten*, 82(1–2), 60–75.
2. Luvion, M. (2000). Prospects for controlling animal parasitic nematodes by predation micro fungi. *Parasitology*, 120 Suppl, S423–S431.
3. Alvar, M. S., Casapà-Morales, C. F., Suárez, J., Miquelena, S., Francisco, J., Jorjón, F. L., ... Mendonça De Osh, P. (2023). Micro predation of *Trichostrongylus axei* spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: A preliminary analysis. *BioRxiv Research International*, 2023.1.4.48454.
4. Casapà-Morales, C., Valenzuela, E., Miquelena, S., Ruiz, J. L., López-Avelino, M. L., ... Paz-Silva, A. (2018). A preliminary study of the biological control of strongylids affecting results in a zoological park. *Journal of Equine Veterinary Science*, 38(12), 1115–1120.
5. Casapà-Morales, C., Ruiz-Vázquez, M. S., Al-Harbi, M., Fernández-Morales, M., Valenzuela-Carrión, C., Ruiz-Luque, J. L., ... Madeira de Carvalho, L. M. (2024). Control Ecológico de Parasitos de Herbívoros Selvagens em Parques Zoológicos. *Parasites & Vectors*, 17, 1–12.
6. Valenzuela, M., Valenzuela-Carrión, C., Ruiz-Vázquez, M. S., Gómez-Caballero, J., ... Madeira de Carvalho, L. M. (2024). Control Biológico de Nematodos Parasitas em Equinos: Genótipos em Estudo em Castiella. *Parasites & Vectors*, 17, 1–12.
7. Trichuris burdens in zoo housed *Canis lupus familiaris*. *International Journal of Parasitology*, 28(9), 1459–1466.
8. Zhao, B. L., Wang, Q., Niu, L., Deng, L., ... Yang, G. (2015). Prevalence of gastrointestinal parasites in captive non-human primates of ten different zoological gardens in China. *Journal of Helminthology*, 89(1), 101–113.
9. Alvar, M. S., Casapà-Morales, C. F., Suárez, J., Miquelena, S., Francisco, J., Jorjón, F. L., ... Mendonça De Osh, P. (2023). Micro predation of *Trichostrongylus axei* spores for preventing soil-transmitted helminth zoonoses: A preliminary analysis. *BioRxiv Research International*, 2023.1.4.48454.
10. Panopoulou-Petrouleou, M. S. (2013). Parasites in Captive Animals: A Review of Studies in Some European Zoos. *Zoologische Garten*, 82(1–2), 60–75.

Agradecimentos: Ao Monte Selvagem, pela colaboração nesta investigação e ao CIISA-FMV-ULisboa, Projeto UIDB/00276/2019, pelo seu financiamento.



22-23 FEV 2019